

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



**LA APOPTOSIS COMO FACTOR PROMOTOR  
DE TUMOROGÉNESIS EN *DROSOPHILA*  
*MELANOGASTER***

TESIS DOCTORAL  
MARÍA MARTÍN MONTERO  
MADRID, 2015

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR  
FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**LA APOPTOSIS COMO FACTOR PROMOTOR  
DE TUMOROGÉNESIS EN *DROSOPHILA*  
*MELANOGASTER***

Memoria presentada por **MARÍA MARTÍN MONTERO**,  
licenciada en Bioquímica, para optar al grado de Doctora en  
Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid

MADRID, 2015

Director de la Tesis:

Prof. GINÉS MORATA PÉREZ

Tutor de la Tesis:

Prof. ERNESTO SÁNCHEZ-HERRERO



**A mi padre**





# ÍNDICE

<b>RESUMEN / SUMMARY</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
La Biología del desarrollo y el cáncer	7
<i>Drosophila melanogaster</i> como organismo modelo	8
Establecimiento de los ejes corporales en el desarrollo y formación de compartimentos	9
Los discos imaginales	9
El estudio del cáncer en <i>Drosophila melanogaster</i>	11
Descripción molecular del gen <i>ras</i>	14
Fenotipo <i>ras</i> <sup>V12</sup> en <i>Drosophila melanogaster</i>	18
Indicios de estimulación de crecimiento tumoral por parte de las células apoptóticas	21
La apoptosis	21
La vía de la c-Jun N-terminal Kinasa (JNK)	23
La competición celular	24
La apoptosis como fuerza conductora del crecimiento de tumores <i>ras</i> <sup>V12</sup>	26
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>27</b>
Medios de cultivo	29
Estirpes de moscas y metodología	29
Sistema binario de expresión Gal4/UAS/Gal80	29
Líneas Gal4, UAS y Gal80 utilizadas	29
Líneas LacZ	30
Alelos mutantes	31
Técnica de recombinación mitótica mediada por Flipasa/FRT ( <i>recombinación “en trans”</i> )	31
Generación de clones mediante el sistema MARCM	32
Marcaje de linaje celular ( <i>recombinación “en cis”</i> )	32
Generación de apoptosis mediante irradiación con rayos X	33

Diseño experimental	34
Inmunohistoquímica	36
Adquisición y tratamiento de imágenes	36
Análisis la tasa de crecimiento de los clones ( <i>"Doubling time" (D.T.)</i> )	37
Medida del área de dominios sal o clones marcados por GFP	37
<b>OBJETIVOS</b>	<b>39</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>43</b>
1.- Descripción detallada del fenotipo celular de <i>ras<sup>V12</sup></i>	45
- Morfología de los clones <i>ras<sup>V12</sup></i> en el disco imaginal de ala y diferenciación a tejido alar adulto	45
- Crecimiento del tejido <i>ras<sup>V12</sup></i>	47
- Linaje celular del tejido sal <sup>EPV</sup> > <i>ras<sup>V12</sup></i>	52
- La mutación <i>ras<sup>V12</sup></i> no induce super-competición celular	53
2.- Señales necesarias para la transformación: la apoptosis inducida irradiación	58
- Respuesta de los clones <i>ras<sup>V12</sup></i> a una dosis elevada de irradiación	59
- Respuesta de los dominios sal <sup>EPV</sup> > <i>ras<sup>V12</sup></i> a una elevada dosis de irradiación	68
- Respuesta de los dominios sal <sup>EPV</sup> >Diap1 a una elevada dosis de irradiación	70
3.- Papel que juega JNK en la inducción de sobrecrecimientos	72
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>81</b>
1. Características de las células que mantienen actividad constitutiva de la vía Ras	83
2. Respuesta de las células <i>ras<sup>V12</sup></i> a irradiación	86
3. Modelo general de tumorigénesis en células <i>ras<sup>V12</sup></i>	88
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>91</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>95</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>99</b>

## RESUMEN / SUMMARY



Los genes *ras* aparecen mutados hacia formas activas en un 30% de los tumores de pacientes humanos, sin embargo, su efecto causal en cáncer no es claro. En este trabajo se ha caracterizado en *Drosophila* el papel de la activación constitutiva de la vía Ras, a través del transgen *ras<sup>V12</sup>*. Hemos analizado esta mutación tanto en clones generados en el disco imaginal de ala y como expresando *ras<sup>V12</sup>* en el dominio *spalt*, que ocupa aproximadamente el 20% del disco. Los clones *ras<sup>V12</sup>* presentan diferentes propiedades de adhesión con las células vecinas silvestres, pero muestran una tasa proliferativa normal y no producen sobrecrecimientos. Sin embargo, cuando los clones o los dominios *spalt* que expresan *ras<sup>V12</sup>* son irradiados (3000R), generan grandes sobrecrecimientos tumorales. Estos son especialmente grandes cuando afectan al dominio *spalt*. Hemos determinado que el factor clave en la respuesta de crecimiento es la resistencia de las células *ras<sup>V12</sup>* a entrar en apoptosis. Como consecuencia de la irradiación con Rayos-X se activa la vía apoptótica JNK pero la mayoría de las células *ras<sup>V12</sup>* sobreviven ya que son refractarias a la apoptosis. En estas condiciones, la actividad de la vía JNK se vuelve permanente y de forma persistente secreta señales mitogénicas que causan los sobrecrecimientos. Este fenómeno es reproducible en células mutantes para el gen *dronc*, que no pueden ejecutar el programa apoptótico. Este resultado sugiere, en contra de la visión actual, que las células apoptóticas tienen un potencial oncogénico que emerge después de un evento de estrés como la irradiación.

Mutations at the *ras* genes are associated with about 30% of tumours in human patients, but their causal effects on cancer are not clear. In this work I have characterised in *Drosophila* the role in tumorigenesis of constitutive function of the Ras pathway, as induced by the *ras<sup>V12</sup>* transgene. I have generated clones of *ras<sup>V12</sup>* expressing cells in the imaginal discs and have also induced *ras<sup>V12</sup>* activity in the spalt domain, that covers approximately 20% of the wing disc. *ras<sup>V12</sup>* clones exhibit cell adhesion differences with neighbour wildtype cells, but show a normal proliferation rate and do not produce overgrowths. Similarly, forcing *ras<sup>V12</sup>* activity in the spalt domain does not cause tissue overgrowth. However, when *ras<sup>V12</sup>* clones or *ras<sup>V12</sup>* spalt domains are irradiated (3000R), they generate large tumorous overgrowths, especially massive in the spalt domain. I have determined that the key factor in the growth response is the resistance of *ras<sup>V12</sup>* expressing cells to enter apoptosis. As a consequence of the X-radiation, the apoptotic JNK pathway becomes activated but most of the *ras<sup>V12</sup>* cells survive as they are refractory to apoptosis. Under these conditions the activity of the JNK pathway becomes permanent and persistently secretes mitogenic signals that cause the overgrowths. These phenomena can be reproduced in cells mutant for the gene *dronc* that cannot execute the apoptosis program. These results suggest that, contrary to the current view, apoptotic cells have an oncogenic potential that arises after stress events like irradiation.

## INTRODUCCIÓN





## La Biología del desarrollo y el cáncer

La historia evolutiva nos cuenta que todos los seres vivos proceden de una misma célula ancestral, es decir, son copias inexactas de esta. Para hacer frente a los cambios que se producían en el ambiente terrestre fruto de la propia existencia de la vida, algunos de estos organismos se asociaron en complejos pluricelulares que mediante mecanismos de mutación, recombinación, transmisión horizontal de genes, simbiosis, etc., les permitía sobrevivir y adaptarse al ambiente cambiante. La adquisición de la pluricelularidad por parte de los metazoos tuvo lugar hace más de 1000 millones de años, este hito permitió la especialización celular en distintas cualidades metabólicas, y así determinadas células y tejidos pudieron desempeñar funciones de mayor complejidad gracias a que otras se encargaban de la nutrición y el mantenimiento.

Los organismos pluricelulares disponen de un plan corporal concreto o “bauplan”. Se trata de un programa ontogenético que guía al cigoto indiferenciado hasta alcanzar la forma adulta completa y funcional, capaz de reproducirse. El “bauplan” dota a los organismos de un programa definido y coordinado de control de crecimiento y adquisición de especialización celular. El plan corporal dispone de sofisticados mecanismos que aseguran la adecuada adquisición del tamaño y la forma de los distintos tejidos adultos: mecanismos de comunicación intercelular, de control del ciclo celular, de supervivencia y de muerte celular programada o apoptosis. Éstos han de estar perfectamente regulados para asegurar el

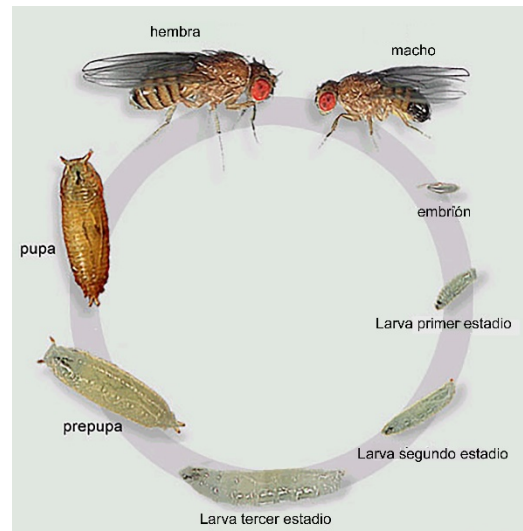
mantenimiento de la homeostasis del organismo. La Biología del Desarrollo, valiéndose de herramientas de otras disciplinas científicas como la Genética, la Biología Molecular y la Citología, se encarga de estudiar el conjunto de procesos que conforman el “bauplan” de un organismo. En ocasiones, se producen fallos en los mecanismos citados anteriormente, y estos pueden tener defectos muy graves en el desarrollo o incluso conducir a enfermedades como el cáncer.

Una importante aportación de la Biología del Desarrollo ha sido el descubrimiento del alto grado de conservación de los procesos y las vías de señalización implicados en el desarrollo, a pesar de la gran diversidad de estructuras, de patrones de crecimiento y de planes corporales presentes en los animales. Existe un número limitado de diseños y recursos que se han reutilizado reiteradamente durante la evolución de las especies (Lawrence, 1992). Es por ello que el uso de organismos modelo permite caracterizar fenómenos complejos de una forma sencilla y posteriormente extrapolarlos a otros organismos y, en última instancia, permite abordar diferentes estrategias para comprender y tratar las enfermedades humanas, como por ejemplo el cáncer.

Entre los organismos modelo más ampliamente estudiados están el nematodo *Caenorhabditis elegans*, el pez cebra *Danio rerio*, la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster* y el ratón *Mus musculus*.

## *Drosophila melanogaster* como organismo modelo

La mosca del vinagre, comenzó a ser utilizada como organismo modelo a principios del siglo XX por la escuela de Thomas Hunt Morgan. En un siglo se han desarrollado un gran número de herramientas moleculares y genéticas que permiten abordar un estudio detallado de las interacciones entre células, tejidos y genes en esta especie. Las características que hacen a *Drosophila* especialmente ventajosa frente a otros sistemas modelo son su pequeño tamaño y facilidad de manejo; posee un ciclo vital muy corto (10 días a 25°C) y en cada ciclo tiene una elevada progenie; carece en gran medida de la redundancia genética presente en mamíferos, facilitando el estudio de fenotipos mutantes; la existencia de cromosomas balanceadores que impiden la recombinación meiótica, permiten el mantenimiento de estirpes mutantes a lo largo de muchas generaciones y la disponibilidad de numerosas herramientas que permiten el control espacio-temporal de la actividad de cualquier gen, facilita el estudio de relaciones genéticas, celulares y tisulares en la morfogénesis. Además, desde comienzos del siglo XXI tenemos a nuestra disposición el genoma secuenciado de *Drosophila melanogaster* (Adams et al. 2000). La disponibilidad de la secuencia de los genomas de distintos organismos nos ha revelado que existe un alto grado de homología entre las distintas especies animales. Se estima, por ejemplo, que la mosca del vinagre y la especie humana tienen aproximadamente un 60% de genes en común (Adams et al. 2000).



**Figura 11. Ciclo vital de *Drosophila melanogaster*.**

El ciclo vital de la mosca del vinagre dura 10 días a una temperatura de 25°C. Consta de una fase embrionaria que dura 24h, tres fases larvarias, las dos primeras de 24h cada una y la tercera de 48h y una fase de pupa en la que acontece la metamorfosis y emerge un individuo adulto fértil. (Tomado de Flymove).

*Drosophila melanogaster* es un insecto holometábolo, es decir, tras la fase larvaria sufre una metamorfosis completa. Tras la puesta del huevo fecundado, pasa 24 horas en fase embrionaria. Seguidamente pasa a la fase larvaria, que tiene una duración de 4 días en condiciones normales (25°C), a lo largo de los cuales se suceden tres estadios larvarios (**Figura 11**). Durante el periodo larvario, unas estructuras epiteliales internas llamadas discos imaginales se encuentran en fase proliferativa y, tras la metamorfosis, darán lugar a la mayoría de las estructuras cuticulares del adulto (cabeza, torax, apéndices, analia y genitalia). Tras finalizar el tercer estadio larvario, la larva prepupal expande los espiráculos anteriores, se inmoviliza, se acorta y progresivamente va endureciendo su cutícula externa hasta entrar

en fase pupal. En la fase pupal se lleva a cabo la metamorfosis y los tejidos larvarios son sustituidos por tejidos adultos. Al inicio de la metamorfosis, los discos imaginales cesan de dividirse, pues han adquirido su tamaño final, y comienzan a proliferar unas células llamadas histoblastos, que son las precursoras de la cutícula abdominal. Tras esta fase pupal de 4-5 días emerge un individuo adulto o imago (Lawrence, 1992).

### Establecimiento de los ejes corporales en el desarrollo y formación de compartimentos

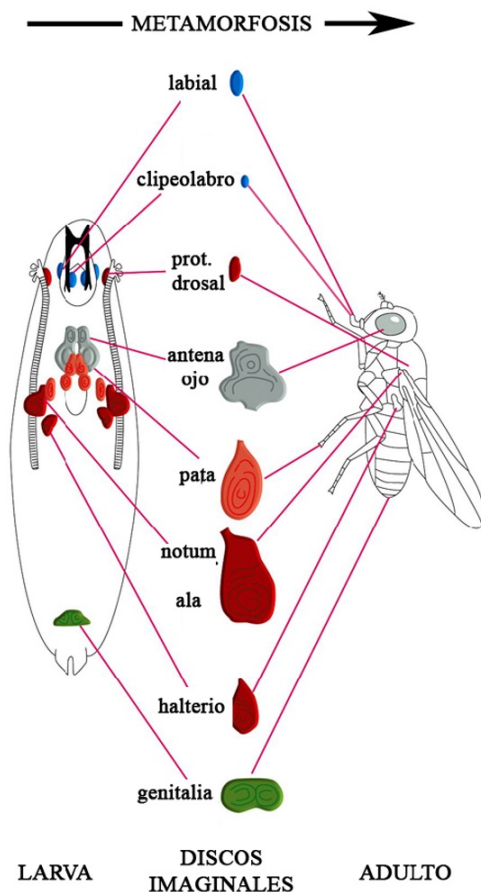
Para el desempeño del “bauplan” cada célula ha de conocer la posición que debe ocupar dentro del organismo y poder diferenciarse adecuadamente. A través de un sistema de gradientes de proteínas morfogénicas se crea un sistema de coordenadas para dotar a las células de información posicional. En el embrión de *Drosophila*, se forma en primer lugar el eje antero-posterior (Frohnhofer et al. 1986; Nusslein-Volhard and Wieschaus 1980) por la generación de gradientes inversos de los mRNA de los genes maternos *bicoid* y *nanos*. Las proteínas Bicoid y Nanos desencadenan la activación de los genes cigóticos “gap” y estos, a su vez, de los “pair rule”, en un patrón de bandas definidas a lo largo del eje antero-posterior, generando 14 parasegmentos. La expresión de estos genes delimita la región de expresión de otros dos grupos de genes: los de “polaridad segmental” y los “Hox”. Los genes de “polaridad segmental” van a determinar la

conversión de los parasegmentos en los segmentos definitivos

Estos dos últimos tipos de genes también se llaman genes selectores, que funcionan como señales binarias, estableciendo así una identidad diferente entre las células que los expresan y las que no lo hacen (García-Bellido 1975; revisado en Mann and Morata 2000). Los genes de polaridad segmental se establecen a partir del establecimiento de 14 bandas de expresión de *engrailed* que otorga identidad posterior (P) a las células y a través de la expresión del morfogeno Hedgehog activa en las células vecinas la expresión de *wingless*, otorgándoles identidad anterior (A) (Morata 2001). De esta forma se establece la subdivisión de cada segmento embrionario en compartimentos (García-Bellido et al. 1973). Los compartimentos son unidades de linaje, la adquisición de una identidad celular concreta va a ser heredable, confiriendo a estas células con la misma identidad una afinidad celular específica que las va a impedir mezclarse con las de otro compartimento (García-Bellido 1975; revisado en Mann and Morata 2000).

### Los discos imaginales:

En *Drosophila* existen 19 discos imaginales (**Figura I2**): dos series simétricas de 10 discos a cada lado del cuerpo de la larva que darán lugar a la cabeza, el tórax con sus respectivos apéndices (alas, halterios, 3 pares de patas y otros apéndices cefálicos) y un disco de simetría bilateral que origina la analia y la genitalia. Los discos imaginales se originan al final de la embriogénesis a partir de



**Figura I2.** Esquema ilustrativo de la localización larvaria de los discos imaginales y los tejidos a los que diferencian en el individuo adulto. (Tomado de Alberts et al. 2002).

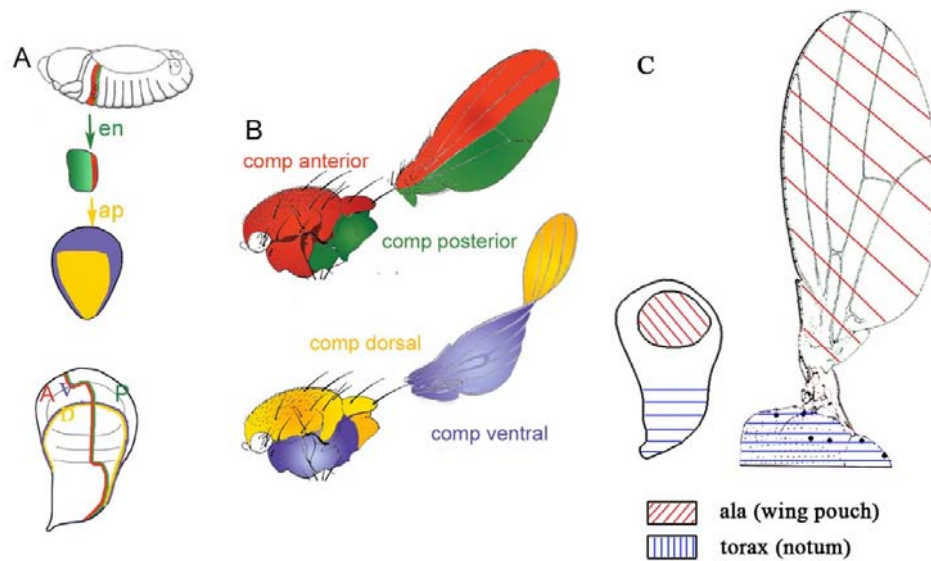
invaginaciones del ectodermo formadas por un pequeño grupo de células de origen policlonal. Constan de dos capas de epitelio enfrentadas por su cara apical que dejan un lumen entre ambas: un epitelio monocapa pseudoestratificado que origina las estructuras cuticulares adultas y la membrana peripodial.

En este estudio vamos a utilizar el disco imaginal de ala, que es probablemente el más caracterizado. El disco de ala da lugar al apéndice alar y al mesonotum, que ocupa la mayor parte de la región cuticular torácica (**Figura I3**). Este disco se origina en el lateral del embrión entre los parasegmentos 4 y 5 por acción de los gradientes de morfógenos

Wingless (Wg) y Decapentaplegic (Dpp). Como consecuencia de esta señalización, se genera la población de células que se invagina (Lawrence and Struhl 1996; Morata 2001) y que está formada tanto por células de identidad de compartimento anterior (A) como de compartimento posterior (P) (definida por la expresión del gen selector *engrailed* (*en*)) (Cohen et al. 1991; Morata and Lawrence 1975). Se ha estimado que el número de células que componen este primordio es de 50 (Martin et al. 2009), estas células sufren 9 rondas de proliferación a lo largo de los distintos estadios larvares hasta que al finalizar el tercer estadio, el disco prepupal adquiere su tamaño final y consta de 30.000 células (Martin et al. 2009). En este momento se encuentran además establecidos todos los elementos de patrón morfológico que se observan en la cutícula adulta.

En el segundo estadio larvario se produce en el disco imaginal de ala una segunda segregación territorial con la aparición de los compartimentos dorsal (D) y ventral (V). El gen selector que otorga identidad dorsal a las células es *apterous* (*ap*) y su ausencia determina a las células como ventrales (Cohen et al. 1992; Diaz-Benjumea and Cohen 1993), formando así un nuevo borde de compartimento perpendicular al A/P. Aproximadamente al mismo tiempo, tiene lugar una tercera división que diferencia células de la región presuntiva de tórax (notum) y células de la región presuntiva de ala (pouch) (Morata and Lawrence 1979).

La compartimentalización de los discos imaginales en el desarrollo genera bordes



**Figura 13. Esquema del proceso de compartimentarización en el tejido imaginal de ala de *D. melanogaster*.** (A) La división entre compartimentos anterior (A) y posterior (P) se produce por la expresión temprana del gen selector *en* en el compartimento P. La división entre dorsal (D) y ventral (V) se produce más tardíamente mediada por la expresión de *ap* en el compartimento D. (B) Correspondencia de los compartimentos larvarios con las estructuras adultas en las que diferencian tras la metamorfosis. (C) Tejido presuntivo de ala y notum en el disco imaginal y su equivalencia en las estructuras cuticulares adultas. (Cedido por Silvia Aldaz).

en los que se produce la confrontación de células con distinto linaje que actúan como centros organizadores del tejido. Los centros organizadores orquestan la formación de patrón y el crecimiento en todo el disco. Sus células generan y secretan morfógenos, unas proteínas difusibles que van a dotar de información posicional a todas las células del tejido. En el disco de ala, debido a la aposición de células A y P, se genera el borde A/P, en una banda de células A, que emite el morfógeno Dpp (Basler and Struhl 1994; Guillen et al. 1995; Zecca et al. 1995) y, perpendicular a éste, por la aposición de células dorsales y ventrales, se origina el borde D/V que emite el morfógeno Wingless (Wg) (Zecca et al. 1996). Estos morfógenos se dispersan formando un gradiente de

concentración decreciente desde su centro organizador hacia las células más distales del disco. El nivel de concentración de morfógeno que percibe cada célula determinará la activación o represión de diferentes genes diana. Esto sucede, por ejemplo, para el gen de respuesta a Dpp, *spalt* (*sal*). El gen *sal* se expresa en la zona central del disco de ala como respuesta a elevadas concentraciones de Dpp (Milan et al. 2002).

### El estudio del cáncer en *Drosophila melanogaster*

Según la OMS, el cáncer es una de las principales causas de muerte por enfermedad en el ser humano en todo el mundo; en 2012 causó 8,2 millones de defunciones. Se prevé



que los casos anuales de cáncer aumentará de 14 millones en 2012 a 22 millones en las próximas dos décadas. Los que más muertes causan cada año son los cánceres de pulmón, hígado, estómago, colon y mama (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>).

“Cáncer” es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; también se habla de “tumores malignos” o “neoplasias malignas”. Una de las mayores dificultades para tratar de modelizar el desarrollo del cáncer es su complejidad. Existen muchos tipos de cáncer que pueden afectar además a diversos tejidos e implicar a distintas rutas de señalización en cada caso. A pesar de estas diferencias, todos los tumores comparten una serie de características comunes (**Figura I4**): Las células tumorales crecen incontroladamente, generalmente reciben una estimulación sostenida de señales proliferativas y evaden las señales supresoras del crecimiento; son capaces de evadir la apoptosis; modifican su metabolismo, pues viven en un ambiente inflamado, e inducen angiogénesis para asegurarse la nutrición y activan la capacidad invasiva de los tejidos adyacentes y también de los lejanos, proceso conocido como metástasis (Hanahan and Weinberg 2011). Además de estas propiedades intrínsecas de las células tumorales, se ha visto que la interacción de estas células con el ambiente que las rodea juega un papel crucial a la hora de proteger a las células tumorales de los ataques del sistema inmune y de promover su crecimiento (Radisky

et al. 2001). Es decir, los múltiples cambios genéticos necesarios para la transformación tumoral, no necesariamente han de tener lugar en la misma célula (revisado en Rudrapatna et al. 2012).

Para poder desentrañar los complejos mecanismos moleculares y genéticos que subyacen al cáncer en humanos, han sido fundamentales los avances realizados en el campo de la Biología del Desarrollo. Los primeros pasos hacia la comprensión de la enfermedad fueron dados en *Drosophila melanogaster* y posteriormente, estos hallazgos fueron validados en vertebrados. Estudios pioneros de principio de la década de los 70, identificaron mutantes de polaridad apico-basal que estaban caracterizados por dramáticos sobre-crecimientos en los tejidos imaginales y nerviosos de la mosca. La mayoría de los tumores sólidos proceden de células epiteliales. Los tejidos epiteliales tienen una polaridad apico-basal bien definida y una de las características de la malignización de un tumor es la pérdida de esta polaridad. Los genes afectados eran *discs-large (dlg)*, *lethal giant larvae (lgl)* y *scribbled (scrib)* (Bryant and Schubiger 1971; Gateff 1978). Cuando estos tejidos eran transplantados a hospedadores silvestres, eran capaces de colonizar e invadir a los tejidos circundantes, demostrando capacidad supresora de tumores de estos genes (Woodhouse et al. 1994; Woodhouse et al. 1998). En estudios posteriores se descubrió que existe una estrecha regulación entre estos genes para promover la polaridad apico-basal celular. Las proteínas codificadas



**Figura 14. Características comunes compartidas por las células tumorales.** Modificada a partir de (Hanahan and Weinberg 2011).

por ellos se encuentran en la superficie basolateral de las células epiteliales formando un complejo que presenta una regulación mutua y antagónica con otros dos complejos que se hallan en la superficie apical y que también son esenciales para el mantenimiento de la polaridad apico-basal: Proteína Kinasa C atípica/Bazooka/PAR-6 y Crumbs/Stardust/Patj (Humbert et al. 2008). Hoy sabemos que el ortólogo humano de *dlg* (*hDLG1*) aparece deslocalizado y con bajos niveles de proteína en varios tumores de colon malignos (Gardiol et al. 2006) e interactúa con el supresor de tumores Apc en cáncer de colon (Matsumine et al. 1996). Del mismo modo, el ortólogo humano para *Ig1* (*Hugl-1*) presenta o muy bajos niveles o ausencia de transcrito y proteína, generalmente porque desaparece la región cromosómica codificante, en un amplio número de tumores (Grifoni et al. 2004; Korshunov et al. 2006; Lassmann et al. 2007; revisado en Rudrapatna et al. 2012).

Además de los genes de polaridad apico-basal se agrupan en la categoría de genes supresores de tumores (TSG) otros genes implicados en diferentes procesos celulares, ya que sus mutaciones se han asociado con tumorigenesis en *Drosophila melanogaster*. Por ejemplo, se ha demostrado que los discos imaginales de mutantes en genes implicados en endocitosis, como *avalanche*, *rab5*, *vps25* y *erupted*, desarrollan sobre-crecimientos tumorales (Lu and Bilder 2005; Menut et al. 2007; Moberg et al. 2005; Thompson et al. 2005). La endocitosis participa en diversos procesos celulares como el establecimiento del gradiente de morfógenos (Fischer et al. 2006) o la activación/inhibición de las rutas de proliferación (Devergne et al. 2007; Menut et al. 2007; Shivas et al. 2010).

Sin embargo, aunque los discos imaginales o los compartimentos mutantes para los TSG desarrollan sobre-crecimientos tumorales, los clones de células mutantes son



eliminados por apoptosis cuando están rodeados de tejido no-mutante. De esta forma se comportan tanto los clones *scrib* o *lgl* (Brumby and Richardson 2003; Igaki et al. 2009; Menendez et al. 2010; Pagliarini and Xu 2003) como los clones *vps25*, *erupted* o *rab5* (Ballesteros-Arias et al. 2014; Herz et al. 2006; Moberg et al. 2005; Thompson et al. 2005). El hecho de que las células mutantes sean viables cuando están rodeadas por otras células mutantes, pero inviables cuando están rodeadas por células silvestres, indica que su eliminación es un fenómeno dependiente de contexto llevado a cabo a través de interacciones celulares. Lo cual sugiere que el mecanismo de competición celular (Morata and Ripoll 1975), que supone un mecanismo de supervivencia que identifica y elimina a las células dañadas o peor adaptadas, está implicado en la eliminación de este tejido mutante.

Para que los clones de células de los genotipos mutantes citados anteriormente lleguen a formar un tumor deben tener alguna ventaja adicional, como la expresión constitutiva de la vía Ras (describimos la vía Ras en un apartado posterior de esta Introducción). Se describieron experimentos en los que células mutantes *lgl* o *scrib* que contienen además *ras<sup>V12</sup>* (*ras<sup>V12</sup>* es una forma mutacionalmente activa del gen *ras*) sobrevivían y generaban crecimientos tumorales (Brumby and Richardson 2003; Igaki et al. 2009; Pagliarini and Xu 2003), por lo que se pensó que *ras<sup>V12</sup>* confería algún tipo de ventaja, que permitía la supervivencia del tumor. Sin embargo, un

análisis detallado de los clones *scrib ras<sup>V12</sup>* y *lgl ras<sup>V12</sup>* demostró que la mayor parte de estos clones eran eliminados por competición celular. Se propuso que la supervivencia del tumor requiere la generación de un microambiente que permite a las células tumorales evadir la competición celular (Menendez et al. 2010). La hipótesis del microambiente está basada en que la competición celular es un fenómeno que opera a corta distancia: las células *tsg ras<sup>V12</sup>* normalmente son eliminadas por las células sanas pero pueden sobrevivir y desarrollar un tumor cuando forman un grupo suficientemente grande para evadir la competición. Las células de la periferia del grupo son eliminadas por apoptosis mientras que las que se encuentran en el centro están protegidas y continúan proliferando. Además, estas células del centro reciben señales proliferativas de las células que están muriendo, lo cual incrementa el crecimiento del tumor. Estudios recientes de nuestro laboratorio, utilizando formas tumorales del gen *rab5* apoyan de forma muy concluyente la hipótesis del microambiente (Ballesteros-Arias et al. 2014).

### Descripción molecular del gen *ras*

En la década de 1980 fueron identificadas las primeras alteraciones genéticas en cánceres humanos procedentes de células somáticas, estas corresponden a mutaciones de ganancia de función de los genes *ras*. Alrededor de un 30% de los tumores humanos analizados tienen mutaciones activadoras en uno de los tres ortólogos del gen *ras* (Tabla I1) (Fernandez-Medarde and Santos 2011).

**Tabla 1. Distribución y frecuencia de mutaciones *ras* en tumores humanos.**

Datos obtenidos del Catálogo Sanger sobre Mutaciones Somáticas en cáncer (<http://sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>). Valores presentados como el porcentaje total de las muestras clínicas analizadas (N mostrado entre paréntesis) para cada tipo de tumor en particular. **En negrita** se representan los tumores que presentan tasas elevadas de mutación en genes *ras* (>10).

ALL= Acute Lymphoblastic Leukemia; CML= Chronic Myeloid Leukemia; CMML=Chronic Myelomonocytic Leukemia; JMML= Juvenile Myelomonocytic Myeloid Leukemia; N/A= not available.

Organ/Tissue	Tumor Type	H- <i>ras</i>	N- <i>ras</i>	K- <i>ras</i>
Biliary tract	Adenocarcinoma	0 (151)	2 (194)	<b>35 (934)</b>
Bladder	Transitional cell carcinoma	<b>12 (1166)</b>	2 (322)	4 (427)
Breast	Carcinoma	1 (542)	2 (330)	4 (544)
Cervix	Adenocarcinoma	9 (249)	3 (64)	8 (611)
Colon	Adenocarcinoma	0 (76)	2 (55)	<b>36 (4310)</b>
	Adenoma	0 (3)	0 (11)	<b>22 (3545)</b>
Ganglia (autonomic)	Neuroblastoma	0 (64)	8 (103)	3 (63)
	Other	N/A	N/A	<b>27 (298)</b>
Leukemias	AML	0 (1216)	<b>12 (3404)</b>	4 (1778)
	CML	0 (265)	3 (532)	2 (313)
	CMML	1 (118)	<b>15 (157)</b>	<b>11 (84)</b>
	JMML	0 (41)	<b>19 (165)</b>	7 (143)
Lymphomas	ALL	0 (284)	<b>10 (703)</b>	7 (549)
	Burkitt's lymphoma	0 (30)	<b>10 (30)</b>	3 (30)
	Hodgkin's lymphoma	2 (44)	<b>16 (45)</b>	0 (44)
	Plasma cell myeloma	2 (185)	<b>20 (484)</b>	6 (403)
Liver	Hepatocellular carcinoma	0 (163)	4 (202)	4 (307)
Lung	Large cell carcinoma	4 (50)	4 (49)	<b>21 (189)</b>
	Non small cell carcinoma	0 (683)	1 (695)	<b>16 (3575)</b>
	Squamous cell carcinoma	1 (261)	0 (360)	6 (1407)
	Other (neoplasia)	N/A	N/A	<b>22 (563)</b>
Pancreas	Ductal adenocarcinoma	0 (110)	1 (138)	<b>69 (3483)</b>
	Endocrine tumor	0 (2)	<b>75 (4)</b>	1 (68)
Prostate	Adenocarcinoma	6 (489)	2 (509)	8 (1002)
Skin	Basal cell carcinoma	7 (180)	1 (147)	4 (147)
	Squamous cell carcinoma	9 (236)	7 (107)	5 (107)
	Malignant melanoma	1 (904)	<b>20 (3466)</b>	2 (924)
Soft tissue	Angiosarcoma	0 (6)	0 (6)	<b>49 (53)</b>
	Leiomyosarcoma	3 (30)	0 (13)	8 (173)
	Liposarcoma	6 (72)	0 (21)	4 (45)
	Rhabdomyosarcoma	4 (158)	<b>11 (151)</b>	4 (162)
	Myxoma	0 (19)	0 (19)	<b>11 (19)</b>
	Malignant fibrous histiocytoma– pleomorphic sarcoma	<b>15 (117)</b>	2 (57)	<b>16 (131)</b>
Stomach	Adenocarcinoma	4 (218)	2 (205)	6 (2054)
	Other	<b>11 (9)</b>	0 (1)	6 (241)
Testis	Germinoma	0 (56)	7 (115)	7 (190)
	Seminoma	<b>17 (30)</b>	0 (30)	0 (23)
Thyroid	Anaplastic carcinoma	4 (440)	<b>17 (436)</b>	9 (433)
	Follicular carcinoma	5 (381)	<b>17 (392)</b>	4 (372)
	Papillary carcinoma	2 (1525)	4 (1941)	2 (1654)
	Hurthle cell carcinoma	<b>16 (44)</b>	4 (26)	0 (41)

Las mutaciones en los diferentes alelos *ras* son frecuentes en algunos de los cánceres con peor pronóstico como los carcinomas de colon o páncreas (Karnoub and Weinberg 2008).

Los genes *ras* fueron descubiertos a finales de la década de 1970 a partir de la observación de la capacidad de transformación tumoral que poseían los retrovirus de sarcoma

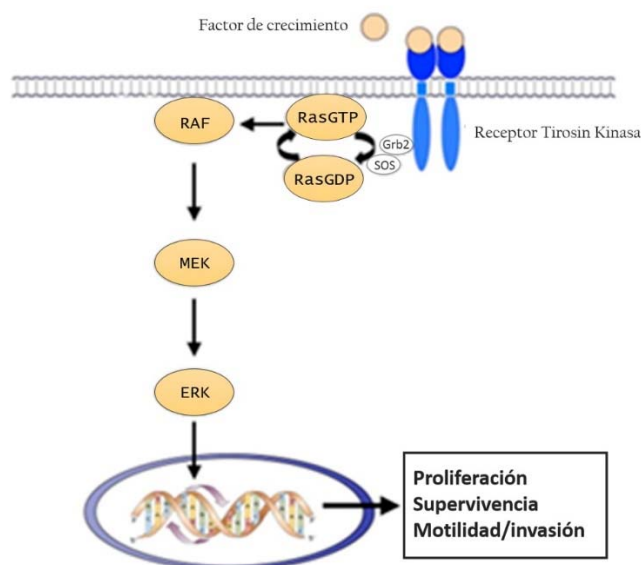
murino Harvey y Kristen. Estos operaban a través de un conjunto de genes comunes que fueron llamados *ras* (de “*rat sarcoma virus*”). Posteriormente se encontraron estos genes *ras* en el genoma de rata (DeFeo et al. 1981). Estos descubrimientos revelaron que los oncogenes *ras* se comportaban de una forma parecida al oncogén *src* del Rous Sarcoma Virus (Stehelin et al. 1976), es decir, proto-oncogenes residentes en el propio genoma de células normales podía ser mutacionalmente activados en potentes oncogenes por retrovirus que adquirían esa secuencia y la transformaban en oncogenes

En humanos existen tres genes que codifican para proteínas Ras: *h-ras*, *k-ras* y *n-ras*. Los primeros dos genes fueron hallados en el genoma de rata (DeFeo et al. 1981) y posteriormente fueron encontradas en los genomas de ratón (R. W. Ellis et al. 1982) y humano (Chang et al. 1982). Estos dos alelos oncogénicos fueron identificados en distintas líneas de células tumorales humanas procedentes de cáncer de vejiga, colon y pulmón (Der et al. 1982; Parada et al. 1982; Santos et al. 1982), y eran idénticos a los alelos silvestres excepto en mutaciones puntuales que resultaban en el reemplazamiento de un aminoácido, generalmente afectando al residuo 12 y en menor frecuencia a los residuos 13 y 61 (Capon et al. 1983; Reddy et al. 1982; Tabin et al. 1982; Taparowsky et al. 1982). Posteriormente, en 1983 se describió la tercera isoforma, *n-ras*, a partir de líneas celulares procedentes de neuroblastoma y leucemia (A. Hall et al. 1983; Murray et al. 1983; Shimizu et

al. 1983; Taparowsky et al. 1983; revisado en Karnoub and Weinberg 2008).

*Drosophila melanogaster* posee tres homólogos de *ras*, pero sólo *Dras1* (a partir de ahora pasará a llamarlo sólo *ras*) presenta suficiente homología de secuencia en su proteína con las proteínas Ras de mamíferos (con un 75% de identidad de secuencia) (Neuman-Silberberg et al. 1984), es decir, se puede considerar un solo homólogo de los tres del genes *ras* presentes en mamíferos (Simon et al. 1991).

La proteína Ras es una proteína G monomérica, una pequeña GTPasa, con actividad reguladora GTP-hidrolasa, que alterna dos conformaciones estructurales. Actúa como “interruptor molecular” (**Figura I5**), adoptando bien una conformación activa, unido a GTP, o bien una conformación inactiva, unido a GDP. Esta propiedad es aprovechada por varias rutas de transducción para transmitir señales desde los Receptores Tirocin Kinasa (RTKs) de la superficie celular al ser activados por factores de crecimiento, a diversas moléculas señalizadoras del interior de la célula, es decir, es capaz de activar distintas rutas de señalización y por lo tanto, distintos tipos de respuestas celulares. Estos receptores incluyen el Receptor para el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) o el Receptor para el Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGFR) en mamífero, cuyos homólogos en *Drosophila* son, respectivamente, dEGFR/DER y Breathless. Otros RTKs presentes en *Drosophila* son Sevenless y Torso.

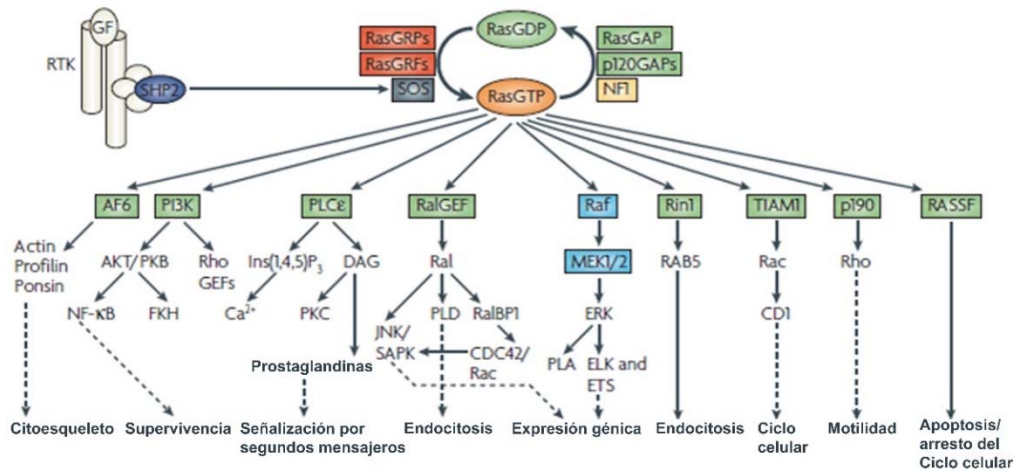


**Figura I5. Ras como “interruptor molecular”.** La proteína GTPasa Ras es una proteína G monomérica que actúa como “interruptor molecular”, adoptando bien una conformación activa, unido a GTP, o bien una conformación inactiva, unido a GDP. Transduce señales desde los Receptores Tirocin Kinasa (RTKs) de la superficie celular al ser activados por factores de crecimiento, a diversas moléculas señalizadoras del interior de la célula, siendo capaz de activar distintas rutas de señalización y por lo tanto, distintos tipos de respuestas celulares. Es especialmente importante la ruta de señalización de las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPK), a través de la interacción con Raf, desencadena una reacción de fosforilaciones en cadena a través de la vía de las MAPK (Raf/MEK/ERK).

El ciclo de “apagado” y “encendido” de la molécula Ras está estrechamente controlado por Proteínas Activadoras de GTPasas (GAPs) que incrementan la actividad GTPasa intrínseca de la proteína Ras y regulan negativamente su actividad. De manera inversa, la actividad de Ras también está regulada por Factores/proteínas liberadoras de GDP (GEFs), que catalizan la eyección de nucleótidos GDP y por tanto facilitando la unión de GTP y la activación de la proteína (revisado en Karnoub and Weinberg 2008). La proteína Ras en su conformación activa, unida a GTP, recluta a la membrana varias proteínas efectoras incluidas Raf, PI3K y Ral.GDS y es capaz de inducir cambios conformacionales activadores en ellas. La proteína Ras activa numerosas rutas de transducción de señales, pero es especialmente

importante la de las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPK). Destacan también la activación de la vía PI3K/AKT y la Ral.GDS, a través de la cual se activa la ruta JNK (**Figura I6**). La activación de diferentes vías de señalización podría ser responsable del carácter pletorópico de esta proteína (revisado en Rommel and Hafen 1998).

En *Drosophila*, se ha implicado al proto-oncogen *ras* en regular y coordinar muchos procesos, tales como proliferación celular (Karim and Rubin 1998), diferenciación (Fortini et al. 1992), patrón (Schnorr and Berg 1996), apoptosis (Bergmann et al. 1998; Kurada and White 1998), migración (Lee et al. 1996), crecimiento celular y progresión en el ciclo celular (Prober and Edgar 2000).



**Figura I6. Carácter pleiotrópico de la vía Ras.** La proteína Ras en su conformación activa unida a GTP, recluta a la membrana varias proteínas efectoras como Raf, PI3K y Ral.GDS, entre otras y es capaz de inducir cambios conformationales activadores en ellas. La vía Ras regula y coordina muchos procesos celulares, tales como progresión en el ciclo celular, supervivencia, apoptosis, remodelación del citoesqueleto, migración, crecimiento celular, motilidad y diferenciación. (Modificada a partir de Karnoub and Weinberg 2008).

## Fenotipo *ras<sup>V12</sup>* en *Drosophila melanogaster*

El alto grado de homología entre el genoma humano y el de *Drosophila melanogaster* permite realizar dos aproximaciones en el estudio del cáncer, aplicar el conocimiento de la genética de *Drosophila* a humanos y modelar tumores humanos en *Drosophila*. Esta segunda aproximación consiste en generar modelos de cáncer en *Drosophila* que refleja mutaciones tumorales humanas o de otros mamíferos que posteriormente pueden ser validados en modelos mamíferos.

Una de las mutaciones de la proteína Ras que aparece con mayor frecuencia en un amplio espectro de tumores humanos es la forma activa en la que un residuo de glicina (Gly<sup>12</sup>) es sustituido por cualquier otro aminoácido (excepto prolina) en la posición 12. Estudios *in*

*vitro*, mediante la construcción de un transgen artificial, *ras<sup>V12</sup>* (en el que Gly<sup>12</sup> es sustituido por Val<sup>12</sup>), demostraron que este cambio es suficiente para conferir un actividad constitutiva de la vía Ras (Barbacid 1987). En diversos trabajos se ha utilizado *ras<sup>V12</sup>* para estudiar las consecuencias de la actividad desregulada de la vía. El estudio de esta mutación en cultivos celulares de mamífero (células MDCK) revela que cuando conviven una población de células sanas con células *ras<sup>V12</sup>*, estas últimas son extruidas apicalmente de la monocapa de células y son capaces de formar agregados y sobrecrecer (Hogan et al. 2009; revisado en Fujita 2011).

Sin embargo, en diversos trabajos en la *Drosophila* la mutación *ras<sup>V12</sup>* no es suficiente para inducir la formación de tumores invasivos en el tejido imaginal (Karim and Rubin 1998; Prober and Edgar 2000), necesita al menos de una segunda mutación para dar lugar a un

tumor invasivo (Brumby and Richardson 2003; Igaki et al. 2009; Menendez et al. 2010; Pagliarini and Xu 2003). El conocimiento que tenemos sobre este mutante se reduce a tan sólo unos pocos estudios previos en este sistema modelo en los que se sugiere que esta mutación confiere cierta capacidad oncogénica a las células que la portan, pero sin conducir a grandes sobre-crecimientos tumorales (Bergmann et al. 1998; Karim and Rubin 1998; Kurada and White 1998; Prober and Edgar 2000).

La expresión ectópica de *ras<sup>V12</sup>* en una franja de células del borde antero-posterior del disco imaginal de ala durante el desarrollo larvario produce un incremento de la tasa proliferativa de estas células, suficiente para incrementar el tamaño del órgano. Este crecimiento no afecta a la arquitectura del epitelio por lo que ha sido definido como hiperplásico. Otro efecto asociado a la expresión de *ras<sup>V12</sup>* en una franja de células en el borde A/P es la inducción no-autónoma de apoptosis (Karim and Rubin 1998). El análisis de la expresión de *ras<sup>V12</sup>* en clones de recombinación mitótica inducidos en discos imaginales revela que hay un aumento de tamaño celular, pero, sin embargo, la tasa proliferativa no varía. La forma redondeada y los bordes lisos de los clones *ras<sup>V12</sup>* sugieren alteraciones en la afinidad celular respecto a las células no-mutantes, que, sin embargo, son capaces de diferenciar a tejido adulto en el tiempo apropiado de desarrollo. Dentro de los clones *ras<sup>V12</sup>* hay un incremento autónomo de los niveles de dMyc y de Cyclina E (CycE), así

como hay una acumulación de células en fase G2 (Prober and Edgar 2000). En base a estos resultados, los autores de este trabajo proponen un mecanismo molecular para explicar el crecimiento de estas células: la activación de la vía Ras a través de la vía MAPK incrementa los niveles de Cyclina E (CycE), que constituye un factor limitante en la transición G1/S del ciclo celular en los discos imaginales (Neufeld et al. 1998), mediante sobre-expresión del factor de transcripción proto-oncogénico dMyc. Tanto en células de mamífero como en levaduras se había observado que la vía de Ras activada promovía la transición entre las fases G1 y S del ciclo celular (Downward 1997; D. D. Hall et al. 1998). La duplicación del genoma en las células retenidas en fase G2 sería responsable del mayor tamaño de estas células (Prober and Edgar 2000).

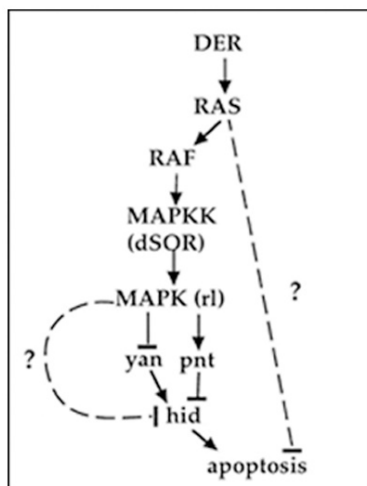
Las células de los organismos pluricelulares necesitan recibir un constante aporte de factores de crecimiento a través del medio extracelular para asegurar su propia supervivencia. La retirada de dichos factores del medio lleva a esas células a la muerte por apoptosis (Barres et al. 1992; Raff et al. 1993). Estudios en células de mamífero habían señalado la ruta Ras/Raf/MAPK como transductora de señales de supervivencia desde el medio extracelular al interior de la célula (Xia et al. 1995). En estudios en el disco imaginal de ojo de *Drosophila* se comprobó que la mutación *ras<sup>V12</sup>* confería protección frente a la apoptosis de manera autónoma celular. Cuando la vía Ras está activa existe una represión transcripcional (Kurada and White 1998) y postranscripcional



(Bergmann et al. 1998) del gen proapoptótico *hid*, en ambos casos mediada por la vía MAPK (Figura 17). De esta forma, la señalización

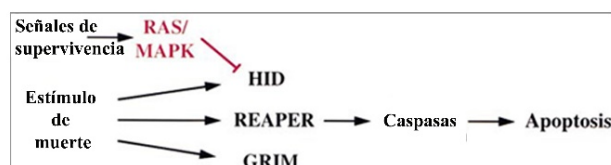
mediada por Ras asegura la supervivencia de las células.

**A**



Kurada and White Cell 1998

**B**



Bergmann, A. et al. Cell 1998

**Figura 17. *Ras*<sup>V12</sup> induce inhibición de la apoptosis a nivel del gen pro-apoptótico *hid*.** La mutación *ras*<sup>V12</sup> confiere protección frente a la apoptosis de manera autónoma celular. Cuando la vía Ras está activa existe una (A) represión transcripcional (Tomada de Kurada and White 1998) y (B) pos-transcripcional del gen pro-apoptótico *hid* (Tomada de Bergmann et al. 1998), en ambos casos mediada por la vía MAPK.

También se ha implicado la activación de la vía Ras en procesos de migración celular, tanto en migración traqueal (Reichman-Fried et al. 1994) como en la migración de las "border cells" en la cámara del huevo de *Drosophila melanogaster* (Lee et al. 1996) y en el cerrado de heridas en mamíferos (Sosnowski et al. 1993). Un sistema modelo para el estudio de los sistemas moleculares que conducen y guían la migración celular es el sistema traqueal de *Drosophila*. Durante el desarrollo embrionario, una vez completadas las divisiones celulares que dan lugar a las 1800 células que forman el sistema traqueal, comienza la migración de las ramas traqueales hasta alcanzar a todos los tejidos del embrión formando una intrincada red de tubos conocida como árbol traqueal. Un gen fundamental para permitir esta migración celular

es *breathless (bth)*, el receptor homólogo en *Drosophila* de FGFR. En embriones mutantes *bth*, la activación constitutiva de vía Ras rescata parcialmente los defectos en migración de las células traqueales hasta alcanzar sus destinos celulares (Reichman-Fried et al. 1994). También se ha analizado el requerimiento espacio-temporal de la activación de la vía Ras en la migración de las células foliculares durante la oogénesis de *Drosophila*. Las "border cells" son un grupo de células foliculares que migran desde el borde anterior de la cámara del huevo hasta el nexo entre las células nurse y el oocito durante el estadio 9 del desarrollo embrionario. Por un lado se ha observado que es necesaria una reducción de la actividad de la vía para promover el inicio de la migración de estas células mientras que la activación de

la misma es indispensable durante la migración de las mismas (Lee et al. 1996).

Principalmente, debido a la contradicción entre los datos en cuanto al crecimiento de estas células (Karim and Rubin 1998; Prober and Edgar 2000), nos parece fundamental realizar el análisis detallado del fenotipo de esta mutación *ras<sup>V12</sup>* que vamos a abordar en este trabajo.

### Indicios de estimulación de crecimiento tumoral por parte de las células apoptóticas

Existen diferentes ejemplos en la literatura en los que la presencia de células apoptóticas en un tejido puede constituir un estímulo para la proliferación de células potencialmente tumorales. En *Drosophila* se ha demostrado que las células apoptóticas que no pueden activar las caspasas efectoras que terminarían por degradarlas, a las que se ha llamado células “no-muertas” (“undead cells” en vocablo inglés), debido a una activación sostenida de la vía JNK, emiten los morfógenos Wg y Dpp y como consecuencia el tejido adyacente sobrecrece en respuesta a las células que “mueren”. A este fenómeno se le ha denominado proliferación compensatoria (Perez-Garijo et al. 2004; Ryo et al. 2004).

En un estudio reciente llevado a cabo en nuestro laboratorio, se ha descrito que el crecimiento de los tumores mutantes para *rab5* depende en gran medida de la presencia de apoptosis dentro del tumor, pues en un fondo mutante para el gen proapoptótico *dronc*, estos tumores no sobrecrecen. Estos datos sugieren

que la apoptosis generada por competición celular podría estar actuando como un factor estimulador del crecimiento de tumores (Ballesteros-Arias et al. 2014).

También en *Drosophila*, se ha descrito que discos imaginales de ojo que contienen clones independientes pero adyacentes *ras<sup>V12</sup>* y *scrib*, desarrollan grandes sobre-crecimientos neoplásicos con capacidad invasiva hacia el tejido nervioso. Es llamativo que los clones *scrib* son eliminados del tejido por apoptosis, siendo las células *ras<sup>V12</sup>* responsables del crecimiento adicional (Wu et al. 2010). Estos autores se refieren a este fenómeno como cooperación interclonal entre las células *scrib* y las *ras<sup>V12</sup>*, lo cual causa la activación de la vía JNK y la subsecuente activación de la vía JAK/STAT, la cual promueve proliferación y tumorigenesis. Esta observación nos sugirió que la apoptosis asociada a los clones *scrib* podría ser la fuerza promotora del crecimiento tumoral de las células *ras<sup>V12</sup>* y nos llevó a plantearnos la hipótesis principal de esta tesis: la apoptosis es capaz de inducir de manera no-autónoma la proliferación de las células *ras<sup>V12</sup>*.

### La apoptosis

Las células de los organismos complejos disponen de mecanismos para producir su propia eliminación. Se denomina apoptosis a un tipo de muerte celular programada, en contraposición a otros tipos de muerte celular patológicos, como la necrosis (Wyllie et al. 1980). La apoptosis es de vital

importancia tanto en el proceso de desarrollo animal como en el mantenimiento de la

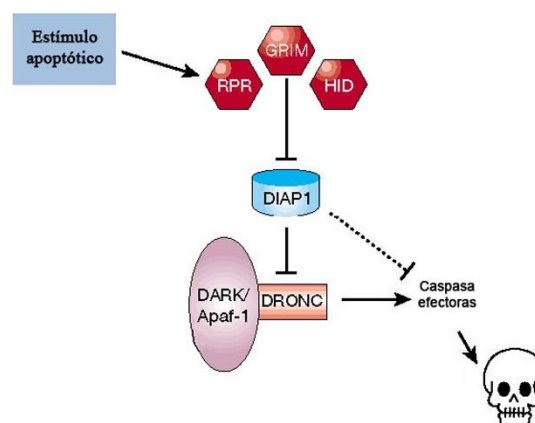


homeostasis de los individuos adultos. La disfuncionalidad de la apoptosis altera el desarrollo en tal grado que, en muchos casos, el animal no es viable. Las moscas del vinagre deficientes para apoptosis mueren en etapas tempranas del desarrollo (White et al. 1994). Por otro lado, en prácticamente todos los organismos la desregulación del proceso apoptótico puede degenerar en enfermedades.

Durante el desarrollo, la apoptosis cumple funciones tan importantes como el esculpido de tejidos y órganos, la eliminación de estructuras innecesarias, el control del número de células suprimiendo aquellas que se generan en exceso o la eliminación de células dañadas o anormales que puedan suponer un potencial peligro para el organismo (Fuchs and Steller 2011; Perez-Garijo and Steller 2015).

La regulación de las rutas que llevan a cabo la apoptosis ha de ser extraordinariamente precisa. Por un lado, es indispensable que las células no entren espontáneamente en apoptosis, pero estas han de ser capaces de activarla cuando el programa de desarrollo lo requiere o cuando existe un daño. Una de las características de las células cancerosas es su habilidad para evadir los mecanismos regulatorios que conducen a la apoptosis (Hanahan and Weinberg 2000).

La base genética de la apoptosis fue descrita en *C. elegans* (H. M. Ellis and Horvitz 1986) y los estudios posteriores han revelado que los componentes moleculares de la vía se han conservado evolutivamente en todos los



**Figura 18. La cascada apoptótica en *Drosophila melanogaster*.** Ante un estímulo apoptótico, las proteínas pro-apoptóticas Rpr, Hid y Grim se unen e inactivan a la proteína anti-apoptótica Diap1. Una vez inactivada Diap1, el apoptosoma, complejo formado por Dark y Dronc, es capaz de activar a las caspasas efectoras Drice, Dcp1 y Decay, que en última instancia son las responsables de la degradación de los sustratos celulares llevando a la célula a la eliminación (Tomado de Meier et al. 2000).

metazoos. La vía de la apoptosis consta de genes pro y anti apoptóticos. Los genes pro-apoptóticos se activan secuencialmente para desencadenar la muerte celular (**Figura 18**). Toda la cascada de eventos desemboca en la activación de una familia de proteasas llamadas caspasas, que, una vez activadas, proteolizan los componentes celulares. Las caspasas que llevan a la degradación de los sustratos celulares se llaman caspasas efectoras. Éstas se encuentran en forma de pro-enzimas inactivas dentro en la célula y tan sólo se activan cuando son proteolizadas por otro grupo de caspasas denominadas iniciadoras. Las caspasas iniciadoras se activan en respuesta a estímulos apoptóticos. En *Drosophila* se han caracterizado dos caspasas iniciadoras, Dronc y Dredd, y tres

caspasas efectoras Dcp-1, Drice y Decay (revisado en Hay and Guo 2006).

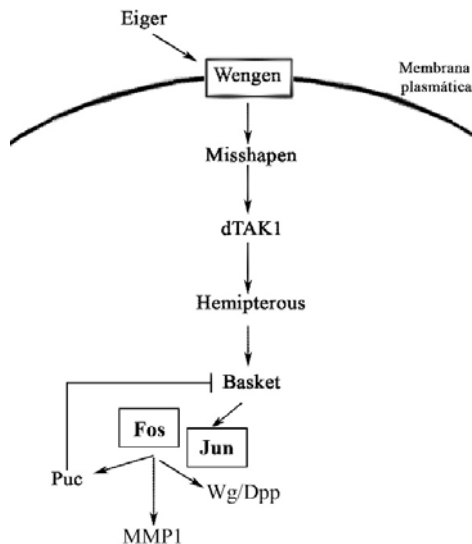
El proceso de regulación de la apoptosis recae sobre las caspasas iniciadoras y es llevado a cabo por proteínas pro-apoptóticas y por proteínas anti-apoptóticas o IAPs ("Inhibitor of Apoptosis Proteins"). En *Drosophila* existen dos representantes de la familia IAP: Diap1 y Diap2. Estas proteínas secuestran tanto las caspasas iniciadoras como las efectoras, bloqueando su capacidad catalítica. Por otro lado, las proteínas pro-apoptóticas en la mosca del vinagre son Reaper (Rpr), Head Involution Defective (Hid), Grim, Sickie (Skl) y Jafrac2. Al activarse, estas proteínas pro-apoptóticas son capaces de unirse a las IAPs y ubiquitinarlas para enviarlas a ser degradadas por el proteasoma. La eliminación de las IAPs permite la activación de las caspasas y la consecución de la muerte de la célula por apoptosis. La mutación de las proteínas IAPs induce la muerte de los embriones de mosca por apoptosis masiva, mientras que su sobreexpresión protege a la mosca de apoptosis inducida por Rpr, Hid y Grim (Goyal et al. 2000).

El disco imaginal de ala de *Drosophila* presenta muy poca apoptosis programada (Milan et al. 1997). Sin embargo, pueden inducirse altos niveles de apoptosis mediante tratamientos de estrés, como pueden ser los rayos X, o un choque térmico prolongado. En concreto, en el caso de los tratamientos con rayos X, se ha descrito que, con una dosis de 1000R, entre el 40% y el 60% de las células del disco de ala mueren por apoptosis (Haynie and

Bryant 1977). A nivel molecular, se ha comprobado que *Dmp53*, el homólogo en *Drosophila* al gen supresor de tumores *p53*, se activa en respuesta a la irradiación y es capaz de activar la expresión del gen pro-apoptótico *rpr* (Brodsky et al. 2000; Ollmann et al. 2000).

### La vía de la c-Jun N-terminal Kinasa (JNK)

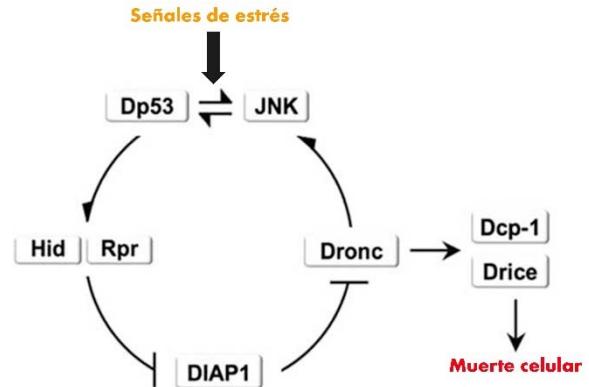
La vía JNK, de la familia de las MAP-quinasas, es una importante ruta de señalización implicada en la respuesta apoptótica en ciertos contextos. Se trata de una ruta de señalización cuya inactivación tiene efectos pleiotrópicos, en procesos tan diferentes como migración celular, proliferación, diferenciación, respuesta inflamatoria o regeneración (Bergantinos et al. 2010a; Bergantinos et al. 2010b; Bosch et al. 2005; Igaki et al. 2006; Kanda and Miura 2004; Wu et al. 2010). En *Drosophila*, la apoptosis inducida por situaciones de estrés, como sucede tras la irradiación con Rayos X, está mediada por la ruta JNK que desencadena la activación del gen pro-apoptótico *rpr* (McEwen and Peifer 2005). La apoptosis producida como consecuencia de la competición celular también está mediada por JNK (de la Cova et al. 2004; Moreno et al. 2002; Moreno and Basler 2004). Por otro lado, un estudio reciente ha demostrado que la caspasa iniciadora Dronc activa un mecanismo de retro-alimentación positiva mediada por JNK y p53 (**Figura 19**) que asegura que una vez la célula toma su decisión de iniciar el proceso apoptótico, se lleva a cabo la consecución de la muerte (Morata et al. 2011; Shlevkov and Morata 2012).



**Figura I9. La vía JNK.** La ruta molecular JNK media respuestas a diversos estímulos y está implicada en procesos como la apoptosis o la migración celular. Uno de los transmisores de estos estímulos es el ligando Eiger que se une a su receptor en la membrana Wengen, desencadenando la activación secuencial de varias quinasas (Misshapen/dTAK1/Hemipterous/Basket). Finalmente, Basket activa a los factores de transcripción Fos y Jun, que desencadenan diversas respuestas en la célula e inducen la expresión de *puc* que actúa como regulador negativo de la vía.

Los componentes moleculares de la vía son quinasas que se activan en sucesivas fosforilaciones. En *Drosophila*, la vía está formada por la JNK, codificada por el gen *basket* (*bsk*), que sirve de sustrato para la JNKK, Hemipterous (Hep), que a su vez sirve de sustrato para varias quinasas apicales JNKKK como dTAK, DASK1 o dMekk1. Estas JNKKK serán activadas por diferentes GTPasas dependiendo de la naturaleza del estímulo. Existen varios receptores de membrana que estimulan la actividad de las GTPasas, como por ejemplo Wengen, Frizzled y PVR. La fosforilación de los componentes moleculares de la vía, desencadena la activación de los

factores de transcripción Fos y Jun. Uno de los genes diana de estos factores es *puckered* (*puc*), una fosfatasa que defosforila e inhibe a la proteína Bsk, actuando como regulador negativo de la vía. Pero también son dianas de esta vía la Metaloproteasa 1 (MMP1), encargada de degradar la matriz extracelular y los mitógenos Wingless (Wg) y Decapentaplegic (Dpp), entre otros (**Figura I10**). En mamíferos, las proteínas JNK están codificadas por tres genes distintos: *jnk1*, *jnk2* y *jnk3*. En fibroblastos de ratón se ha visto que la falta de *jnk1* y *jnk2* disminuye la proliferación y confiere resistencia a la apoptosis inducida por irradiación (Tournier et al. 2000). La sobreexpresión de algún componente de ruta JNK en estos mismos fibroblastos desencadena la respuesta apoptótica (revisado por Weston and Davis 2002).



**Figura I10. Modelo del bucle apoptótico.** Un estímulo de estrés puede inducir la activación de las proteínas pro-apoptóticas Rpr y Hid a través de la ruta JNK y/o Dp53. Ambas vías además pueden retroactivarse mutuamente. Existe además otro punto de retroalimentación positiva de la ruta apoptótica a nivel de la caspasa iniciadora Dronc, capaz de activar de nuevo la vía JNK o Dp53. (Modificado de Shlevkov and Morata 2012).

## La competición celular

La competición celular es un proceso interactivo que fue descrito por primera vez en

los discos imaginales de *Drosophila melanogaster* (Morata and Ripoll 1975), aunque estudios recientes en ratón revelan que se trata de un mecanismo conservado en el reino animal (Claveria et al. 2013; Norman et al. 2012). Constituye un mecanismo general de supervivencia que identifica y elimina las células que son más débiles o aquellas que son anómalas, o bien que estén peor adaptadas a su contexto celular que sus vecinas. Esta eliminación de células es llevado a cabo mediante apoptosis inducida por la vía JNK (Moreno et al. 2002). Su función asegura la uniformidad genética de las poblaciones celulares y también contribuye a mantener sanos los tejidos (Amoyel and Bach 2014). Como parte de su función de vigilancia, la competición celular ejerce un papel terapéutico, destruyendo las células oncogénicas que pueden aparecer durante el desarrollo de los tejidos (revisado en Morata and Ballesteros-Arias 2014).

El fenómeno fue originalmente descrito en experimentos que alteraban la dosis de los genes *Minute* (*M*) presentes en las células imaginales (Morata and Ripoll 1975). Los genes *Minute* codifican para proteínas ribosómicas, por lo que la reducción de la dosis de estas proteínas en las moscas heterocigóticas limita la capacidad de síntesis proteica de las células. Las larvas heterocigóticas para el gen *M* (*M*<sup>+/-</sup>) son viables y fenotípicamente normales, excepto por presentar unas quetas más cortas, y tan sólo muestran un retraso en el desarrollo, debido precisamente a la disminución de la tasa proliferativa. Sin embargo, estas mismas células

*M*<sup>+/-</sup> que son viables y capaces de formar un individuo adulto, son eliminadas cuando están rodeadas de células silvestres (con una tasa de proliferación normal) y su desaparición se debe a la interacción con las células silvestres (Morata and Ripoll 1975; Simpson and Morata 1981). En el experimento recíproco, en el que se generan clones *M*<sup>+</sup> (con una tasa de proliferación normal) en un fondo *M*<sup>+/-</sup> (con baja tasa de proliferación), los clones *M*<sup>+</sup> ocupan gran parte del tejido (Morata and Ripoll 1975) en detrimento de las células *M*<sup>+/-</sup> que rodean al clon y que están siendo eliminadas (Li and Baker 2007; Martin et al. 2009; Simpson and Morata 1981) (revisado en Morata and Ballesteros-Arias 2015).

Posteriormente se ha ampliado el fenómeno de competición celular a otros genes, entre otros dMyc y la vía Ras/Raf/MAPK. Se ha descrito que diferentes niveles de dMyc en las células también dispara el fenómeno de competición celular. En un contexto en el que se yuxtaponen células con diferentes niveles de dMyc, las células con niveles más bajos de esta proteína son eliminadas por apoptosis inducida a través de la ruta JNK (de la Cova et al. 2004; Moreno and Basler 2004). En este caso, también se apreció que no sólo son eliminadas las células que tienen menos dosis de dMyc de lo normal, sino que incluso las células silvestres son eliminadas cuando están en contacto con células que expresan mayores niveles de dMyc. A estas células capaces de eliminar por competición celular a células silvestres se les denomina supercompetidoras (Moreno and Basler 2004).

La vía de Ras/Raf/MAPK también se ha implicado en competición celular. Durante muchos años esta vía ha sido considerada crucial en supervivencia celular. Está descrito que la activación de la vía MAPK bloquea la apoptosis a nivel del gen pro-apoptótico *hid* y durante mucho tiempo se ha considerado este hecho suficiente para promover la supervivencia de forma autónoma (Bergmann et al. 1998; Diaz-Benjumea and Hafen 1994; Kurada and White 1998; Yang and Baker 2001, 2003). Los clones con la actividad de la vía inhibida, como sucede para el mutante *ras85D*, que suprime la vía Ras, mueren por apoptosis. Sin embargo, las eliminaciones de las células *ras85D* se puede revertir al yuxtaponerlas con células M/+ (Prober and Edgar 2000). Entonces, una explicación alternativa es que las células deficientes en la señalización de MAPK son eliminadas por sus vecinas. Por otro lado, la expresión de *ras<sup>V12</sup>* en una franja de células del borde A/P, induce la apoptosis no-autónoma de las células silvestres silvestres (Karim and Rubin 1998), sugiriendo que una activación sostenida de la vía de las MAPK también induce super-competición (revisado en Amoyel and Bach 2014).

### La apoptosis como fuerza conductora del crecimiento de tumores *ras<sup>V12</sup>*

Resumiendo, las mutaciones activadoras de los genes *ras* aparecen muy frecuentemente en los tumores de peor pronóstico en cánceres humanos. Por estudios en *Drosophila*, sabemos que la activación constitutiva de la vía, mediante el transgen *ras<sup>V12</sup>*, no es suficiente para inducir la formación de tumores invasivos en el tejido imaginal

(Bergmann et al. 1998; Karim and Rubin 1998; Kurada and White 1998; Prober and Edgar 2000), aunque colabora con otras mutaciones en TSGs en esta transformación tumoral (Brumby and Richardson 2003; Igaki et al. 2009; Pagliarini and Xu 2003). Sin embargo, no se ha acometido una descripción exhaustiva del fenotipo de la forma mutante *ras<sup>V12</sup>*, estudio que acometemos en esta tesis.

Existen distintos modelos tumorales en *Drosophila melanogaster* en los que coexisten células que proliferan y pueblan el tumor con células apoptóticas: los tumores *rab5* (Ballesteros-Arias et al. 2014); las células *tsg ras<sup>V12</sup>* que desarrollan tumores neoplásicos que pueden explicarse mediante la hipótesis del microambiente (Brumby and Richardson 2003; Igaki et al. 2009; Menendez et al. 2010; Pagliarini and Xu 2003; Wu et al. 2010) y la cooperación inter-clonal entre clones independientes *scrib* y *ras<sup>V12</sup>*, en el que la muerte por apoptosis de las células *scrib*, mediada por JNK, podría inducir la transformación neoplásica de las células *ras<sup>V12</sup>* (Wu et al. 2010). Además, se sabe que las células apoptóticas secretan señales mitogénicas, debido a la activación de la vía JNK (Pérez-Garijo et al. 2004; Ryoo et al. 2004).

El objetivo principal de esta tesis consiste en hacer una descripción detallada del fenotipo que presenta la mutación *ras<sup>V12</sup>* en discos imaginales de *Drosophila* estudiar el potencial tumorigénico de las mismas y analizar el papel que podría tener la apoptosis en transformación tumoral de *ras<sup>V12</sup>*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**





### Medios de cultivo

Todas las estirpes utilizadas así como los cruces requeridos en esta tesis se mantuvieron en medio de cultivo estándar y en cámaras de incubación a una temperatura constante de 25°C y 75% de humedad relativa del aire.

### Estirpes de moscas y metodología

Toda la información relativa a las estirpes de moscas utilizadas en esta tesis se encuentra en la dirección web: <http://flybase.org/>.

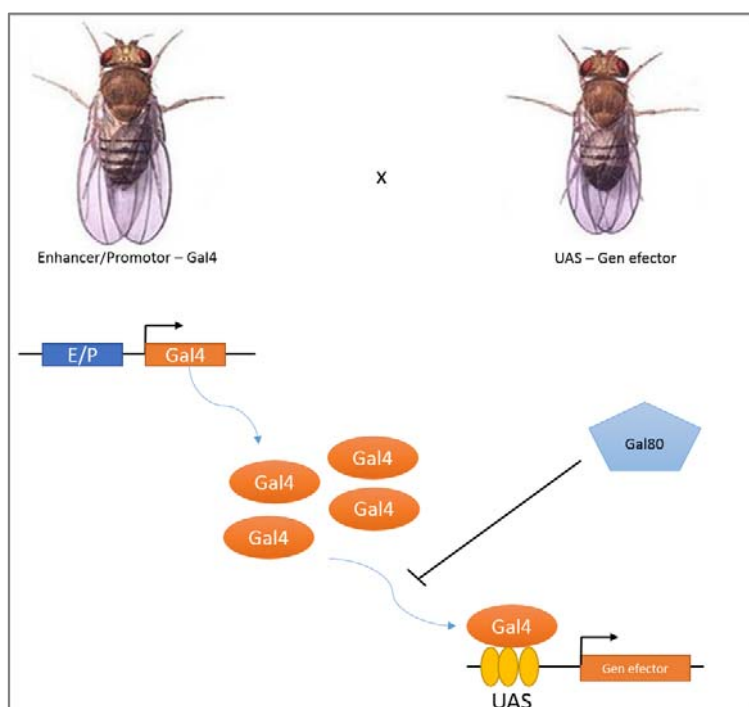
### Sistema binario de expresión Gal4/UAS/Gal80

El sistema binario Gal4/UAS/Gal80 es un sistema de expresión génica procedente de levaduras ampliamente utilizado en *Drosophila melanogaster*. Permite dirigir la expresión de un gen efector que se encuentra bajo el control de una secuencia activadora UAS ("Upstream Activating Sequence") (Brand and Perrimon 1993) mediante un elemento activador

transcripcional llamado Gal4. La proteína Gal4 reconoce y se une a estas secuencias UAS promoviendo la transcripción del gen efector (**Figura M1**). La expresión del gen Gal4 está dirigida bien por un promotor ectópico, o bien por el "enhancer" de un gen endógeno del cual copia su patrón de expresión espacio-temporal. Adicionalmente se puede añadir un represor de la actividad transcripcional de Gal4 llamado Gal80. Esta proteína se une específicamente a la proteína Gal4 inhibiendo su actividad.

### Líneas Gal4, UAS y Gal80 utilizadas

Las líneas Gal4 utilizadas en esta tesis han sido *tubulina*-Gal4 (*tub*-Gal4), siendo *tubulina* el promotor del gen *tubulina* cuya expresión es ubicua, que permite dirigir la expresión del Gal4 constitutivamente en todas las células imaginales, y el elemento P *spalt* (*sal*<sup>EPV</sup>-Gal4, al que llamaré *sal*<sup>EPV</sup>), que dirige la expresión de Gal4 en el dominio de expresión del gen *spalt* (*sal*).



**Figura M1. Sistema binario de expresión génica Gal4-UAS-Gal80.** El sistema consta de dos elementos básicos, un trans-activador llamado Gal4 cuya expresión se encuentra regulada espacio-temporalmente por un "enhancer" o promotor específico y por otro lado el gen efector que se desea expresar bajo el control de la secuencia activadora UAS a las que se une Gal4. Al mantener ambos elementos separados en líneas distintas de *Drosophila*, se evitan posibles efectos deletéreos y sólo al efectuar un cruce tiene lugar la sobre-expresión. El sistema consta además de un elemento represor, Gal80, cuya actividad puede ser modulada dentro del experimento y que permite añadir al método un nivel adicional de control temporal.



Una peculiaridad del dominio *sal* es que constituye un “dominio abierto”, esto significa que células inicialmente pertenecientes al dominio pueden salir de él y perder la expresión del gen *sal* y por tanto del driver *sal<sup>EPV</sup>* y de las construcciones génicas cuya expresión dirige. El dominio *sal* está definido por la concentración de Dpp que reciben las células. De hecho, el gen *sal* responde a altas concentraciones del mismo. La proteína Dpp se genera y difunde una franja desde el borde A/P hacia las células anteriores y posteriores del epitelio, generando un gradiente de concentración decreciente. A medida que el epitelio crece las células se van alejando de esta fuente de Dpp y el dominio *sal* va a quedar definido por una distancia determinada a ese centro organizador del disco. Si por alguna circunstancia las células inicialmente pertenecientes al dominio *sal* se alejaran más allá de esta distancia, perderían la expresión de *sal<sup>EPV</sup>*. Para poder visualizar variaciones de tamaño del dominio marcamos el linaje del mismo con un *cassette* de marcaje de linaje.

Las líneas UAS utilizadas han sido UAS-Flp, que dirige la expresión de la proteína recombinasa Flipasa (Flp); UAS-GFP, que dirige la expresión de la proteína verde fluorescente y nos permite visualizar las células en las que está funcionando el sistema Gal4/UAS (“*Green Fluorescent Protein*” GFP); UAS-Diap1, que dirige la expresión de la proteína inhibidora de la apoptosis IAP1 de *Drosophila* (DIAP1), esta proteína inhibe a las caspasa y por tanto protege de la muerte por apoptosis a las células que la expresa; UAS-*ras<sup>V12</sup>*, con la cual

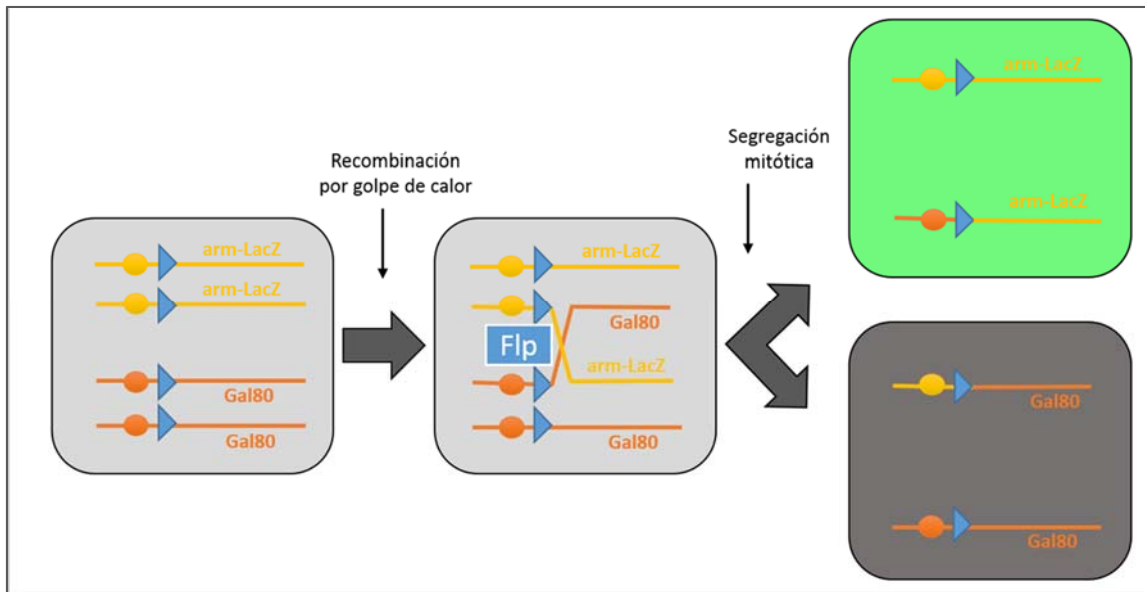
conseguimos que la vía de Ras se encuentre constitutivamente activa (Barbacid 1987); UAS-*bsk\_RNAi* (VDRC ID 34139), en este caso, el RNA de interferencia del gen *basket* elimina la expresión de este gen, inhibiendo a su vez la ruta molecular JNK; UAS-*puc14C*, que permite sobre-expresar el gen *puc*, que es además de un gen diana de la vía JNK, un regulador negativo de la misma.

La línea Gal80 utilizada, ha sido *tub*-Gal80, cuya expresión es ubicua y está acoplada a la secuencia FRT40A, que permite su utilización en el sistema MARCM.

### Líneas LacZ

Para analizar el nivel de transcripción de diferentes genes, se utilizan estirpes en las que se encontraba insertado el gen bacteriano *lacZ* en el locus de genes de interés. La estirpe utilizada es *puckered*-LacZ (*puc*-LacZ o *pucE69*), mutante hipomorfo del gen *puckered*, que utilizamos como “*read-out*” de la activación de la vía JNK. Por otro lado Puc actúa como regulador negativo de la vía JNK. Esta mutación sólo sobrevive en heterozigosis, con lo que los animales que la portan tendrán una sola dosis silvestre del gen *puc* y esto las hace a su vez más sensibles a la apoptosis.

El genotipo de las larvas utilizadas para la detección de la actividad JNK mediante esta construcción son: *w*, *sal<sup>EPV</sup>*, UAS-GFP / UAS-*ras<sup>V12</sup>*; *puc*-LacZ / +. Para testar si funciona el *bsk\_RNAi*: *w*, *sal<sup>EPV</sup>*, UAS-GFP / UAS-*ras<sup>V12</sup>*; *puc*-LacZ / UAS-*bsk\_RNAi*. En fondo refractario a la apoptosis (*dronc<sup>-/-</sup>*): *w*, *sal<sup>EPV</sup>*, UAS-GFP / +; *puc*-LacZ, *dronc<sup>l24</sup>* / UAS-*ras<sup>V12</sup>*, *dronc<sup>l29</sup>* y <sup>9</sup>



**Figura M2. Técnica de recombinación mitótica mediada por Flp/FRT. Sistema MARCM.** La recombinación mitótica mediada por la recombinasa Flp sobre secuencias FRT “en *trans*” permite el intercambio de cromátidas hermanas. Esto va a permitir una segregación cromosómica asimétrica en la división celular de aquellas células en las que la recombinación suceda. En el ejemplo mostrado puede suceder que una célula herede dos copias de *tub-Gal80* y ninguna de *arm-LacZ*. De manera recíproca, la otra célula hija heredará 2 copias del marcador *arm-LacZ* y ninguna de *tub-Gal80*, de forma que, al perder el represor podrá activar, tanto ella como su descendencia, la expresión de los genes de interés flanqueados por la secuencia UAS que porte el diseño de nuestro experimento.

también: *w*, *sal*<sup>EPV</sup>, *UAS-GFP* /+; *puc-LacZ*, *dronc*<sup>24</sup> / *dronc*<sup>2</sup>

### Alelos mutantes

Para la realización de esta tesis se utilizaron los siguientes alelos nulos:

*dronc*<sup>24</sup> / TM6B

*dronc*<sup>29</sup> / TM6B: Este alelo ha sido caracterizado (D. Xu et al. 2005) y su mutación en homocigosis se caracteriza por ser resistente a apoptosis. Se utilizó, por tanto, en los experimentos en los que se requería un fondo genético defectivo para apoptosis.

### Técnica de recombinación mitótica mediada por Flipasa/FRT (*recombinación “en trans”*)

La técnica de recombinación mitótica mediada por Flipasa/FRT (T. Xu and Rubin 1993) procede de levadura. La proteína recombinasa Flipasa (Flp) media la recombinación entre secuencias FRT (“*Flipase Recombination Target*”) localizadas en la misma posición de cromosomas homólogos (“*trans*”). Esta técnica permite una segregación mitótica que genera células homocigóticas a partir de células heterocigóticas para el brazo cromosómico en el que se encuentra el FRT, posibilitando así la generación de tejidos quiméricos (Figura M2).

### Generación de clones mediante el sistema MARCM

Los clones de sobre-expresión se realizaron usando el sistema MARCM (*"Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker"*) (Lee and Luo 1999). Este sistema combina la técnica de recombinación mitótica Flp/FRT con el sistema Gal4/UAS/Gal80. Esta técnica utiliza la construcción *hs-Flp112* (Struhl and Basler 1993) en la que la expresión de Flp se controla por un promotor dependiente de temperatura. De este modo se puede controlar el momento del desarrollo en el que se quiere inducir la formación de los clones mediante un choque térmico a 37°C. Esta técnica permite expresar genes ectópicos dentro de las células que recombinan y que forman clones para así estudiar sus interacciones con las células silvestres del disco imaginal. Los clones se realizaron con choques térmicos a 37°C de 10 ó 15 minutos, siempre 48-72 horas después de la puesta (AEL).

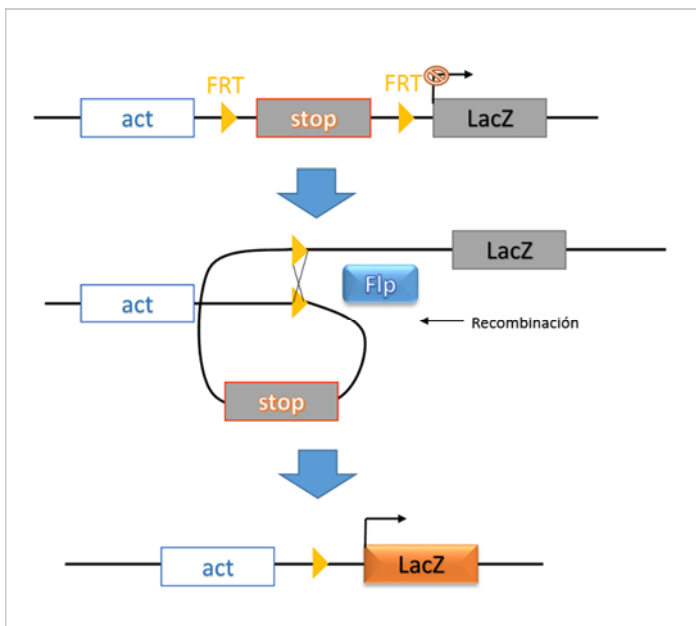
Con este sistema se generaron tanto los clones *ras<sup>V12</sup>*, como los clones neutros que utilizamos como control. El genotipo de las larvas en las que generamos los clones *ras<sup>V12</sup>* es: *yw*, *hs-Flp*, *tub-Gal4*, *UAS-GFP*; *arm-LacZ*, *FRT40A* / *tub-Gal80*, *FRT40A*; *UAS-ras<sup>V12</sup>* / +. El genotipo de las larvas con clones neutros es: *yw*, *hs-Flp*, *tub-Gal4*, *UAS-GFP*; *arm-LacZ*, *FRT40A* / *tub-Gal80*, *FRT40A*. En ambos casos los clones están marcados por la GFP. Para permitir la visualización de los clones *ras<sup>V12</sup>* en alas adultas usamos como marcador adulto la mutación *Crinkle* (*Ck*) que tiene las quetas alares más cortas. El genotipo de estas moscas

es: *yw*, *hs-Flp*, *tub-Gal4*, *UAS-GFP*; *Ck*, *FRT40A* / *tub-Gal80*, *FRT40A*; *UAS-ras<sup>V12</sup>* / +.

En esta tesis, el método utilizado para la generación de los clones *ras<sup>V12</sup>*, es el método MARCM. Teóricamente, este método permitiría obtener en el mismo evento de recombinación, y por tanto poder estudiar el crecimiento de los clones experimentales (clon) y los controles neutros (gemelo o *"twin"*) en el mismo tejido imaginal. En nuestras manos, las células con doble copia de la construcción *tub-Gal80*, es decir, las células *twin*, desaparecen. Por esta razón, para poder comparar el crecimiento de células *ras<sup>V12</sup>* con el de células silvestres, hemos generado los clones en larvas independientes.

### Marcaje de linaje celular (recombinación "en cis")

La técnicas de recombinación Flp/FRT permite la recombinación secuencias FRT (>) mediada por la recombinasa Flp. Cuando las secuencias FRT se posicionan *"en cis"* dentro de mismo cromosoma, al producirse la recombinación tiene lugar la escisión de la secuencia flanqueada por ambos FRT. Esta técnica se conoce con el nombre de *"Flp-out"* (Struhl and Basler 1993) y permite poner en contacto las secuencias adyacentes a los FRT, de forma que si se dispone de una secuencia promotora a un lado del *cassette* escindible y un transgen al otro lado, sólo se activará este último en las células en las que suceda la recombinación. Esta técnica permite el seguimiento del linaje celular de una línea Gal4. Usando una línea UAS-Flp se consigue recombinar un *cassette* en todo el dominio de expresión de dicha línea. Esta recombinación es



**Figura M3. Marcaje de linaje celular.** Cuando la Flp actúa sobre secuencias FRT “en *cis*” se lleva a cabo la escisión de la secuencia comprendida entre ambas. En el caso mostrado, la escisión de una secuencia de parada de la transcripción acerca el promotor ubicuo *act* al gen de la betha-galactosidasa (*LacZ*), induciendo la expresión constitutiva de este en las células en las que la recombinación acontece. La construcción UAS-Flp consigue recombinar un *cassette* en todas las células de un dominio de expresión. Al ser la recombinación irreversible y heredable podemos seguir el linaje celular de una línea Gal4.

irreversible y permite marcar a estas células y a toda su progenie de forma indeleble para el marcador del *cassette* (Struhl and Basler 1993; Weigmann and Cohen 1999). Una vez recombinado el *cassette*, podemos detectar células que ya no forman parte del dominio en cuestión pero que si lo hicieron en una etapa anterior al tratamiento (**Figura M3**). Con este fin hemos utilizado la construcción *act5C>stop>LacZ* (Struhl and Basler 1993).

La línea Gal4 utilizada para el análisis del linaje celular ha sido *sal<sup>EPV</sup>*. Principalmente hemos analizado la expansión del linaje derivado de la expresión de *UAS-ras<sup>V12</sup>*. Los genotipos de las larvas utilizadas son: *w; sal<sup>EPV</sup>, UAS-GFP/+; act5C>stop>lacZ, UAS-Flp/ UAS-ras<sup>V12</sup>* para el experimento y: *w; sal<sup>EPV</sup>, UAS-GFP; act5C>stop>lacZ, UAS-Flp/ +* para el control. Para compararlo con el linaje derivado de la expresión del anti-apoptótico Diap1: *w; sal<sup>EPV</sup> UAS-GFP/+; UAS-Diap1/ act5C>stop>lacZ, UAS-Flp*. Para estudiar el papel de JNK en la expansión del linaje: *w; sal<sup>EPV</sup>/ UAS-ras<sup>V12</sup>; act5C>stop>LacZ, UAS-Flp/UAS-bsk<sub>RNAi</sub>* y el

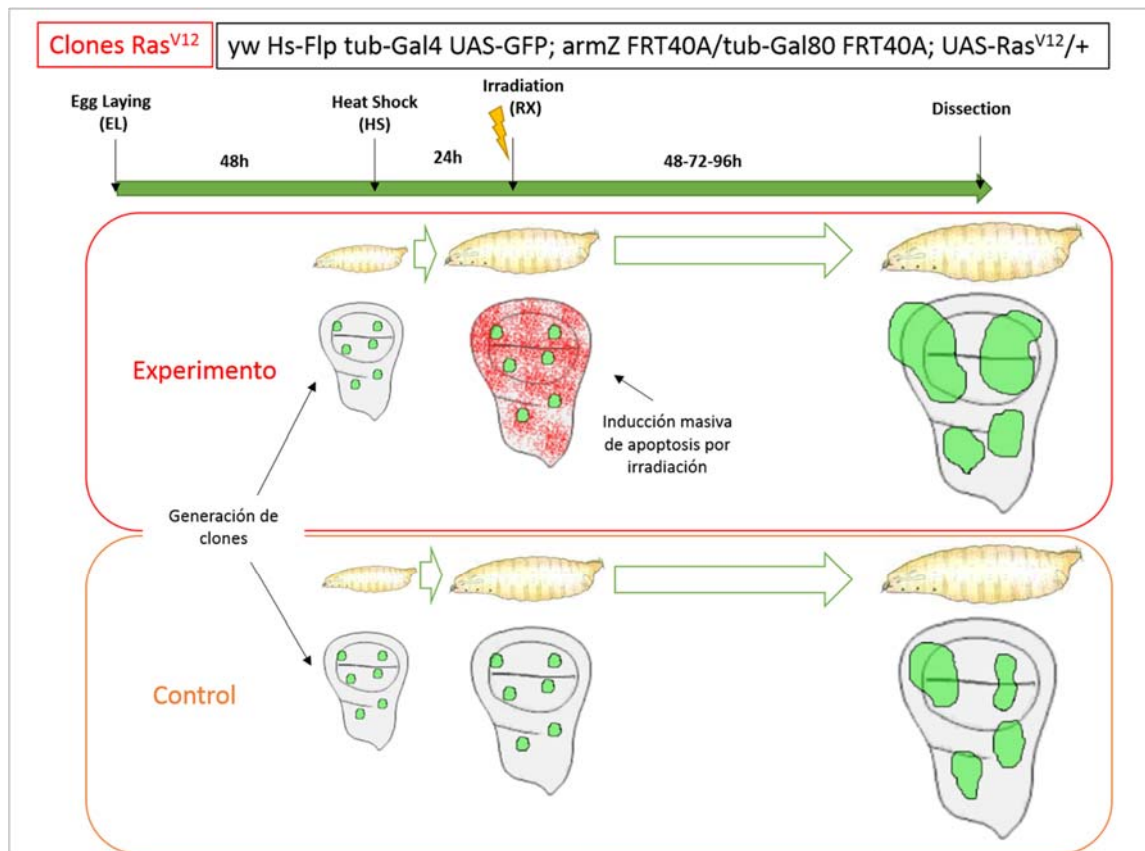
control adicional: *w; sal<sup>EPV</sup>, UAS-GFP/+; UAS-bsk/ act5C>stop>LacZ, UAS-Flp*. Para estudiar la expansión del linaje en un fondo genético protegido de la apoptosis: *w; sal<sup>EPV</sup>, UAS-GFP/ act5C>stop>lacZ; UAS-Flp, dronc<sup>24</sup> UAS-ras<sup>V12</sup>, dronc<sup>29</sup>*.

### Generación de apoptosis mediante irradiación con rayos X

Como método para inducir apoptosis generalizada en los tejidos imaginales se utiliza la irradiación con rayos X. La irradiación se llevó a cabo en una máquina de rayos-X Philips y se administró una dosis estándar de 3000R. Se ha comprobado que con una dosis de 1000R, entre el 40% y el 60% de las células del disco de ala mueren por apoptosis (Haynie and Bryant 1977). En nuestros experimentos, el tratamiento de irradiación se administró en distintos estadios del desarrollo larvario y las larvas se recolectaron en tercer estadio tardío, es decir de 24 a 96 horas después del tratamiento.

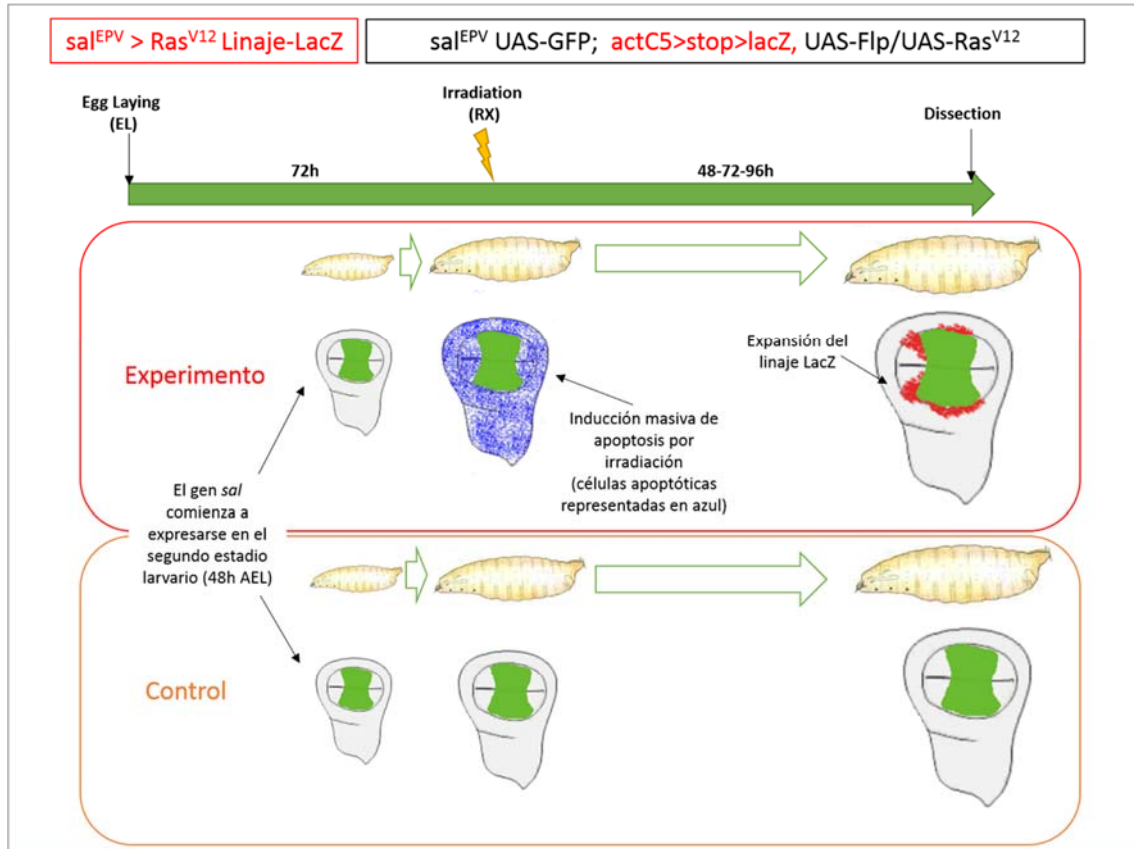
## Diseño experimental

Clones *ras<sup>V12</sup>* sometidos al tratamiento de irradiación para inducir apoptosis masiva (Figura M4)



**Figura M4. Diseño experimental para estudiar el efecto de la irradiación en clones *ras<sup>V12</sup>*.** Hacemos dos puestas de 24h en paralelo del genotipo adecuado para generar clones *ras<sup>V12</sup>*. Dejamos que las larvas crezcan durante 48h a 25°C y sometemos a las puestas a un choque térmico de 15 minutos a 37°C. Tras 24h a 25°C sometemos a una de las puestas a una dosis elevada de irradiación mientras que la otra puesta nos servirá de control sin irradiar. Diseccionamos y fijamos las larvas con clones de las distintas puestas cuando van llegando al tercer estadio larvario; 48, 72 y/o 96h tras el tratamiento de irradiación. Realizamos tinciones para marcar los núcleos o las membranas celulares. Montamos los discos imaginales en preparaciones para microscopía confocal y tomamos las imágenes de los discos completos con el mismo aumento para poder realizar mediciones del área normalizada de los clones (área de los clones respecto al área total del disco) con el software de tratamiento de imágenes adecuado para poder detectar posibles diferencias de tamaño en respuesta a irradiación.

Dominios  $sal^{EPV}>ras^{V12}$  sometidos al tratamiento de irradiación para inducir apoptosis masiva (Figura M5)



**Figura M5. Diseño experimental para estudiar el efecto de la irradiación en la expansión del linaje  $sal^{EPV}>ras^{V12}$ .** Hacemos dos puestas de 24h en paralelo del genotipo adecuado para obtener dominios  $sal^{EPV}$  de sobreexpresión de  $ras^{V12}$  y el correspondiente *cassette* de marcaje de linaje. Dejamos que las larvas crezcan durante 72h a 25°C, de forma que nos aseguramos que todas las larvas de la puesta han alcanzado el segundo estadio larvario y por tanto han comenzado a expresar el gen *sal*, y sometemos a una de las puestas a una dosis elevada de irradiación mientras que la otra puesta nos servirá de control sin irradiar. Diseccionamos y fijamos las larvas de ambas puestas cuando alcanzan el tercer estadio larvario; 48, 72 y/o 96h tras el tratamiento de irradiación. Realizamos una inmunotinción con anticuerpo anti-beta-galactosidasa para marcar el linaje del dominio, además de tinciones para marcar los núcleos o las membranas celulares. Montamos los discos imaginales en preparaciones para microscopía confocal y tomamos las imágenes de los discos completos con el mismo aumento para poder realizar mediciones tanto del área normalizada de los dominios  $sal^{EPV}$  como del linaje marcado con el software de tratamiento de imágenes adecuado para detectar las posibles diferencias en la expansión del linaje.



## Inmunohistoquímica

Las larvas se diseccionaron en PBS en hielo durante 20 minutos. Se fijan 30 minutos en paraformaldehído 4% con 0,1% de DOC y Tritón X-100. Se realizan 3 lavados con solución de lavado (PBS + Tritón X-100 0,03% + Albúmina de Suero Bovina (BSA)). Se incuba con los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C. Se retira el anticuerpo y se realizan cuatro lavados de 15 minutos con solución de lavado. El anticuerpo secundario se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente, posteriormente se retira y se hacen otros cuatro lavados de 15 minutos con PBT al 0,03%. Los discos se montaron en Vectashield (Vector Company, Inc).

Para detectar células en división se usó el anticuerpo anti-Histona 3 fosforilada (PH3) que marca la fase M del ciclo celular.

El marcaje aceptado para detectar células apoptóticas es la técnica TUNEL ("*TdT-mediated dUTP nick endo-labeling*") que marca DNA fragmentado, característico de las células apoptóticas. La técnica TUNEL se llevó a cabo siguiendo el protocolo de Milan y cols. (Milan et al. 1997). Se validó en nuestro sistema el uso de marcaje inmuno-histoquímico con el reactivo TUNEL de los anticuerpos para las caspasas apicales caspasa 3 activada humana (Casp3), que reconoce a la caspasa Drice, y el anticuerpo para la caspasa de *Drosophila* Dcp1.

Los anticuerpos utilizados en esta tesis fueron: anti-caspasa 3 activada (conejo) 1:50 (*Cell Signalling Technology*), anti-Dcp1 (conejo) 1:200 (*Cell Signalling Technology*), anti-Histona

3 fosforilada (conejo) 1:100 (*Cell Signalling Technology*), anti-βGalactosidasa (ratón) 1:50 (*Hibridoma Bank*), anti-ERK fosforilada 4370 Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E)XP® mAb (conejo) 1:100 (*Cell Signaling Tecnology*), anti-Wingless (ratón) 1:50 (DSHB(4D4)), anti-Metaloproteasa-1 (*Hibridoma Bank*) 1:50 a partir de una mezcla de tres anticuerpos en proporción 1:1:1 de referencias 3A6B4, 3B8D12 y 5H7B11 contra el dominio catalítico de Mmp1 (*Hibridoma Bank*), anti-dMyc (cobaya) 1:100 generado en el laboratorio (no publicado), anti-Yki (cobaya) 1:100 generado en el laboratorio (no publicado).

Los anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforo verdes, rojos y/o rojo lejano se emplearon en una dilución 1:200 y proceden de Alexa Molecular Probes.

El marcaje de núcleos fue realizado con el reactivo TO-PRO3 (en adelante TORPO) en una dilución 1:300 y para marcaje de F-actina, que en células imaginales forma un citoesqueleto cortical y se emplea para marcar membrana plasmática, se utilizó Phalloidina-Cy5 (Sigma) a una dilución 1:200.

## Adquisición y tratamiento de imágenes

Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal se realizaron en un microscopio Leica TCS SPE o Zeiss LSM510. Para la composición de imágenes para su posterior tratamiento, así como las mediciones de área de clones, discos imaginales y dominios sal<sup>EPV</sup> se utilizó el software Fiji-ImageJ y Adobe-Photoshop y las gráficas y estadística posterior

se realizaron con el programa Microsoft Office Excel 2010.

### **Análisis la tasa de crecimiento de los clones (*"Doubling time"* (D.T.))**

Hacemos dos puestas de 24h en paralelo de los genotipos adecuados para obtener clones marcados con GFP, que expresen *ras*<sup>V12</sup> por un lado y clones neutros por otro, en ambos casos mediante el sistema MARCM. Tras dejar crecer las puestas durante 48h, se las somete a un choque térmico de 10' a 37°C para inducir la formación de clones. De esta forma generamos entre 3 y 8 clones por disco. Los discos fueron fijados 72h después del choque térmico, montados y analizados al microscopio confocal. La tasa de crecimiento de los clones fue analizada mediante *"Cell doubling time"* (D.T.), que fue calculado usando la fórmula  $(\log 2 / \log N) \cdot h$ , siendo N el número medio de células por clon y h el número de horas transcurridas desde el choque térmico hasta el momento de la fijación.

### **Medida del área de dominios sal o clones marcados por GFP**

El área marcada por GFP fue medida con el software Fiji, ajustando el "Threshold" en el canal verde de la imagen y referida al área total del disco para normalizar las medidas. Los p valores fueron calculados mediante el t-test de dos colas de student.





## **OBJETIVOS**



En esta tesis nos hemos planteado los siguientes objetivos:

- Describir con detalle el fenotipo autónomo y no-autónomo celular de la mutación *ras*<sup>V12</sup> en dominios sal<sup>EPV</sup> y en clones.
- Estudiar la posible inducción de supercompetición celular por parte de las células *ras*<sup>V12</sup>.
- Estudiar el efecto de la apoptosis inducida por una elevada dosis de irradiación (3000R) en la transformación tumoral de las células *ras*<sup>V12</sup>.
- Analizar el papel que juega JNK en la transformación tumoral mediada por irradiación.



## RESULTADOS



## 1.- Descripción detallada del fenotipo celular de *ras<sup>V12</sup>*

Como paso previo al estudio de los efectos de la radiación sobre el tejido, procedimos a la descripción y el análisis del fenotipo celular que produce la activación constitutiva de la vía Ras en el tejido imaginal de ala de *Drosophila melanogaster*, por un lado para confirmar que el alelo *ras<sup>V12</sup>* que estábamos utilizando se comportaba como estaba descrito en trabajos anteriores y por otro para estudiar cómo crece este tejido con relación al tejido silvestre y poder posteriormente separar estos efectos de los inducidos en respuesta a irradiación.

La expresión del transgén *ras<sup>V12</sup>* en el borde antero-posterior del disco de ala puede inducir proliferación y muerte celular no-autónoma (Karim and Rubin 1998). Sin embargo, la interpretación de estos resultados es problemática ya que esta región del disco sirve como principal centro organizador de patrón. Estas células secretan Dpp y a su vez reciben mayores concentraciones de este morfógeno. Por lo tanto, los efectos descritos podrían no deberse a efectos autónomos de la activación constitutiva de la vía Ras. Para evitar potenciales complicaciones de las modulaciones específicas de región sobre la actividad de la vía, en un estudio posterior se llevan a cabo el estudio de *ras<sup>V12</sup>* en clones (Prober and Edgar 2000). Nosotros, para confirmar los fenotipos descritos por ellos llevamos a cabo el mismo abordaje: hemos expresado *ras<sup>V12</sup>* en clones marcados generados en el disco de ala, para poder analizar los efectos autónomos y no-

autónomos celulares derivados de la actividad Ras.

De manera complementaria, y pretendiendo recrear un contexto en el que un elevado número de células dentro del tejido alar activara constitutivamente la vía Ras, utilizamos la línea *sal-Gal4<sup>EPV</sup>* (que llamaremos en adelante *sal<sup>EPV</sup>*), para dirigir la expresión de *UAS-ras<sup>V12</sup>* dentro del dominio *spalt* (*sal*), que constituye el 20% del área total del disco (*sal<sup>EPV</sup> > ras<sup>V12</sup>*). Una característica de esta línea Gal4 es que constituye un dominio abierto. Esto significa que no existen bordes de linaje como sucede con los dominios cerrados (un ejemplo de dominio cerrado sería el compartimento posterior del disco de ala y el borde del mismo sería el borde A/P), por lo tanto, existe un dinamismo entre las células que conforman el dominio y las circundantes. Células que inicialmente pertenecían al dominio podrían perder la expresión de *ras<sup>V12</sup>* al dejar de expresar el *sal<sup>EPV</sup>*. Del mismo modo, células externas al dominio, podrían potencialmente ganar la expresión de *ras<sup>V12</sup>* si acceden a esta región. La expresión de *sal<sup>EPV</sup>* depende de la información posicional que aporta la dosis del morfógeno Dpp emanado por las células del borde A/P del disco imaginal. Por lo tanto, un potencial incremento de tamaño del dominio, podría producir la pérdida de la expresión del *sal<sup>EPV</sup>* y, por tanto, de *ras<sup>V12</sup>*.

### - Morfología de los clones *ras<sup>V12</sup>* en el disco imaginal de ala y diferenciación a tejido alar adulto

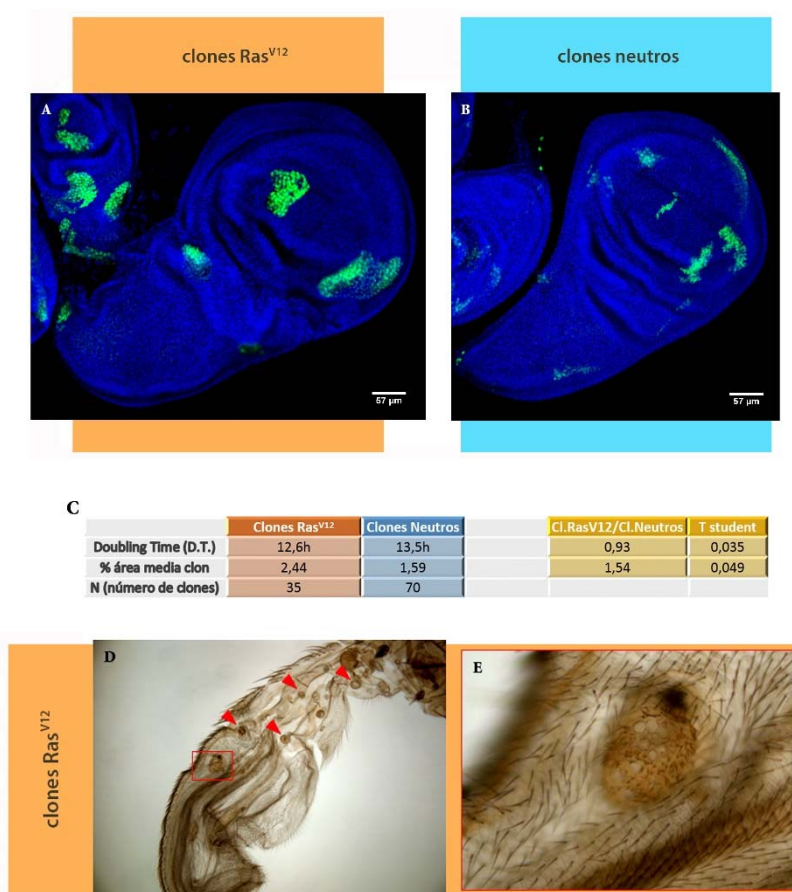
En primer lugar analizamos la morfología de los clones *ras<sup>V12</sup>* generados



## RESULTADOS

mediante el sistema MARCM (ver Materiales y Métodos) a las 48-72h de desarrollo. El genotipo de estas larvas es *yw*, *hs-Flp*, *tub-Gal4*, UAS-GFP; *arm-LacZ*, FRT40A / *tub-Gal80*, FRT40A;

UAS-*ras*<sup>V12</sup> / +, para el caso de los clones *ras*<sup>V12</sup>, mientras que para larvas con clones neutros es: *yw*, *hs-Flp*, *tub-Gal4*, UAS-GFP; *arm-LacZ*, FRT40A / *tub-Gal80*, FRT40A.



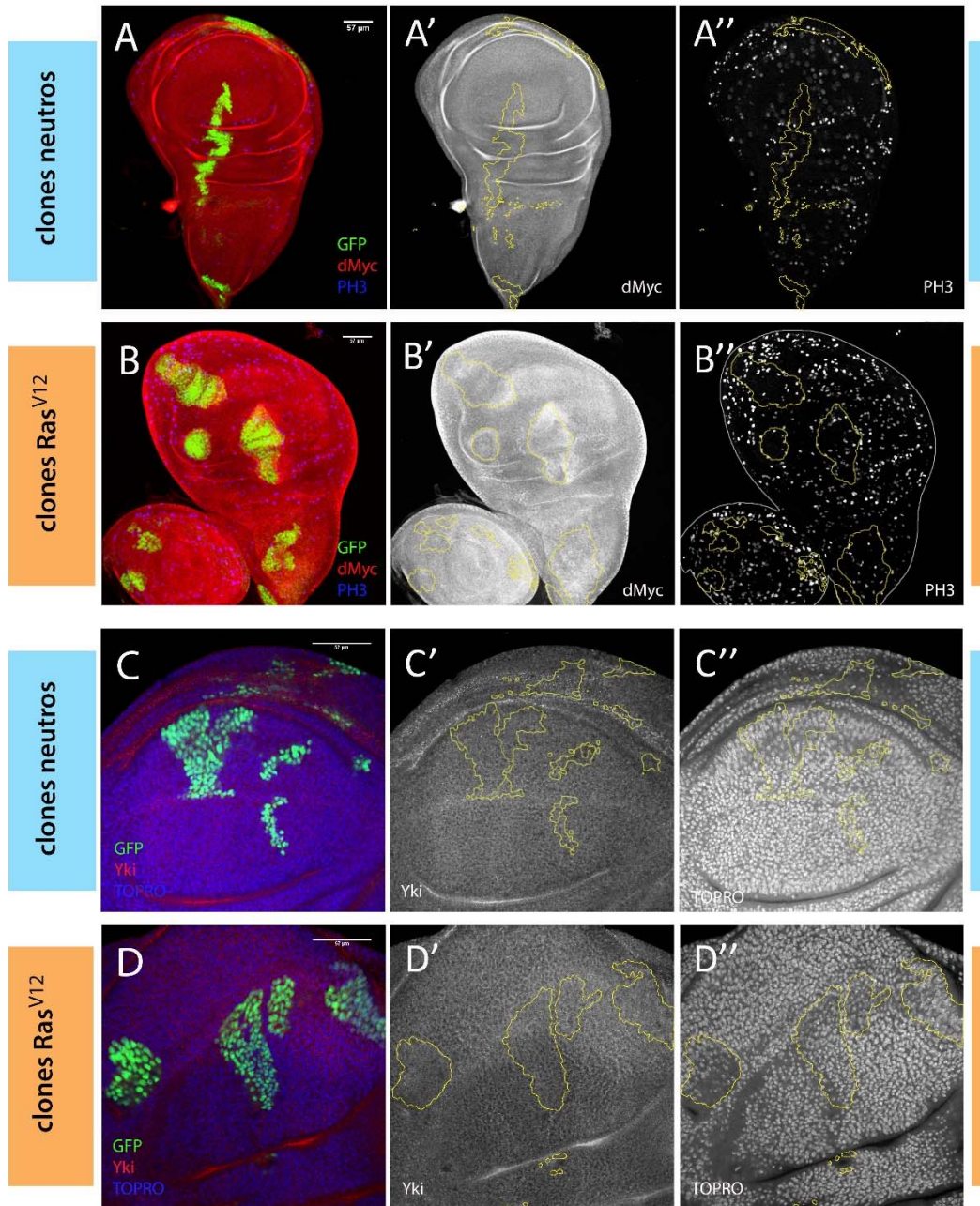
**Figura R1.** Los clones *ras*<sup>V12</sup> tienen forma redondeada, no pierden la estructura monocapa propia del epitelio imaginal y son capaces de diferenciarse a tejido alar adulto. (A, B) Discos imaginales de ala con clones de 72h generados mediante el sistema MARCM marcados en verde por la proteína GFP y con tinción nuclear TOPRO en el canal azul. (A) Disco con clones *ras*<sup>V12</sup> cuyo genotipo es *yw*, *hs-Flp*, *tub-Gal4*, UAS-GFP; *arm-LacZ*, FRT40A / *tub-Gal80*, FRT40A; UAS-*ras*<sup>V12</sup> / +. (B) Disco con clones neutros (control) cuyo genotipo es *yw*, *hs-Flp*, *tub-Gal4*, UAS-GFP; *arm-LacZ*, FRT40A / *tub-Gal80*, FRT40A. Nótese el aspecto redondeado de los clones *ras*<sup>V12</sup> y el tamaño ligeramente mayor de estos clones respecto al de los clones neutros. (C) Tabla en la que se representan el % área media del disco que ocupan los clones individuales *ras*<sup>V12</sup> y los clones control, también está representada la tasa proliferativa de cada tipo de clones calculada mediante un análisis de "cell doubling time" (D.T). El área media ocupada por clones individuales *ras*<sup>V12</sup> es un 54% mayor que la de los correspondientes controles. La relación entre los valores de D.T. obtenidos es prácticamente 1 (0,93;  $p < 0,05$ ), indicando que las células *ras*<sup>V12</sup> no presentan una diferencia significativa en la tasa proliferativa respecto a las células control. (D, E) Ala adulta con clones *ras*<sup>V12</sup> marcados por *Crinckle* (*Ck*). El genotipo de estas moscas es *yw*, *hs-Flp*, *tub-Gal4*, UAS-GFP; *ck*, FRT40A / *tub-Gal80*, FRT40A; UAS-*ras*<sup>V12</sup> / +. Apréciase que los clones son capaces de diferenciarse a tejido alar adulto en el momento del desarrollo adecuado. (E) Ampliación del recuadro marcado en la imagen D.

A diferencia de los clones neutros (control), los clones *ras<sup>V12</sup>* presentan una morfología redondeada en el disco imaginal de ala de tercer estadio (**figura R1.A**), posiblemente indicando unas características de adhesión diferentes de las presentadas por las células silvestres (**figura R1.B**). Sin embargo, estos clones no pierden la estructura monocapa característica de este epitelio y, además, son capaces de diferenciar a tejido alar (**figura R1.D**). Estas características sí que encajan dentro de la definición de tejido hiperplásico, pero para serlo debe cumplir el requisito de poseer un mayor índice proliferativo. Lo analizamos a continuación.

#### - Crecimiento del tejido *ras<sup>V12</sup>*

Para describir el crecimiento de estos clones *ras<sup>V12</sup>* respecto al tejido silvestre, se compara su tamaño con el de los clones neutros generados al mismo tiempo. En cruces realizados en paralelo, generamos mediante el mismo evento de choque térmico clones *ras<sup>V12</sup>* por un lado y clones silvestres por otro. Dejamos crecer estas larvas hasta que alcanzan el tercer estadio tardío y las diseccionamos, también al mismo tiempo, para estudiar las diferencias en tamaño entre los dos tipos de clones (**Figuras R1.A y R1.B**). Cuando comparamos el área media de los clones observamos que los clones *ras<sup>V12</sup>* son mayores que los controles, adquieren un tamaño un 54% mayor que el de los clones neutros ( $p < 0,05$ ). A pesar de esta diferencia de tamaño, la relación de la tasa de crecimiento entre ambos tipos de

clones analizada mediante “cell doubling time” (C.D.T., en adelante y en el gráfico de la figura 1, D.T.) es prácticamente 1 (0,93;  $p < 0,05$ ) (**Figura R1.C**), lo cual indica que apenas hay diferencia en el índice proliferativo de las células *ras<sup>V12</sup>* respecto a las células silvestres (Para la descripción del análisis D.T., ver el apartado correspondiente en Materiales y Métodos). Estos resultados concuerdan con lo publicado por (Prober and Edgar 2000). De manera complementaria, analizamos la proliferación de estas células. Para ello nos valimos de un marcador de la fase M del ciclo celular, el anticuerpo que reconoce la proteína Fosfohistona 3 (PH3), y tampoco encontramos diferencias con el tejido silvestre tanto en clones (**Figura R2**) como en dominios *sal<sup>EPV</sup> > GFP* *ras<sup>V12</sup>* (**Figura R3**). En el caso de los experimentos realizados en el dominio *sal<sup>EPV</sup>* los genotipos de las larvas utilizadas son: *w*; *sal<sup>EPV</sup>*, *UAS-GFP/+*; *UAS-GFP/+* para los controles (*sal<sup>EPV</sup> > GFP*) y *w*; *sal<sup>EPV</sup>*, *UAS-GFP/+*; *UAS-ras<sup>V12</sup> /+* para los experimentos (*sal<sup>EPV</sup> > GFP* *ras<sup>V12</sup>*). Si la diferencia de tamaño de estos clones no se debe a un incremento en la tasa de crecimiento de las células *ras<sup>V12</sup>*, entonces podría deberse a un aumento del tamaño celular. En el trabajo de (Prober and Edgar 2000) señalan que la activación constitutiva de la vía Ras en clones, promueve la activación del ciclo celular. Concretamente, describen la activación autónoma celular de dMyc que a su vez regula CycE y promueven la transición entre las fases G1/S del ciclo. Encuentran mayor proporción de

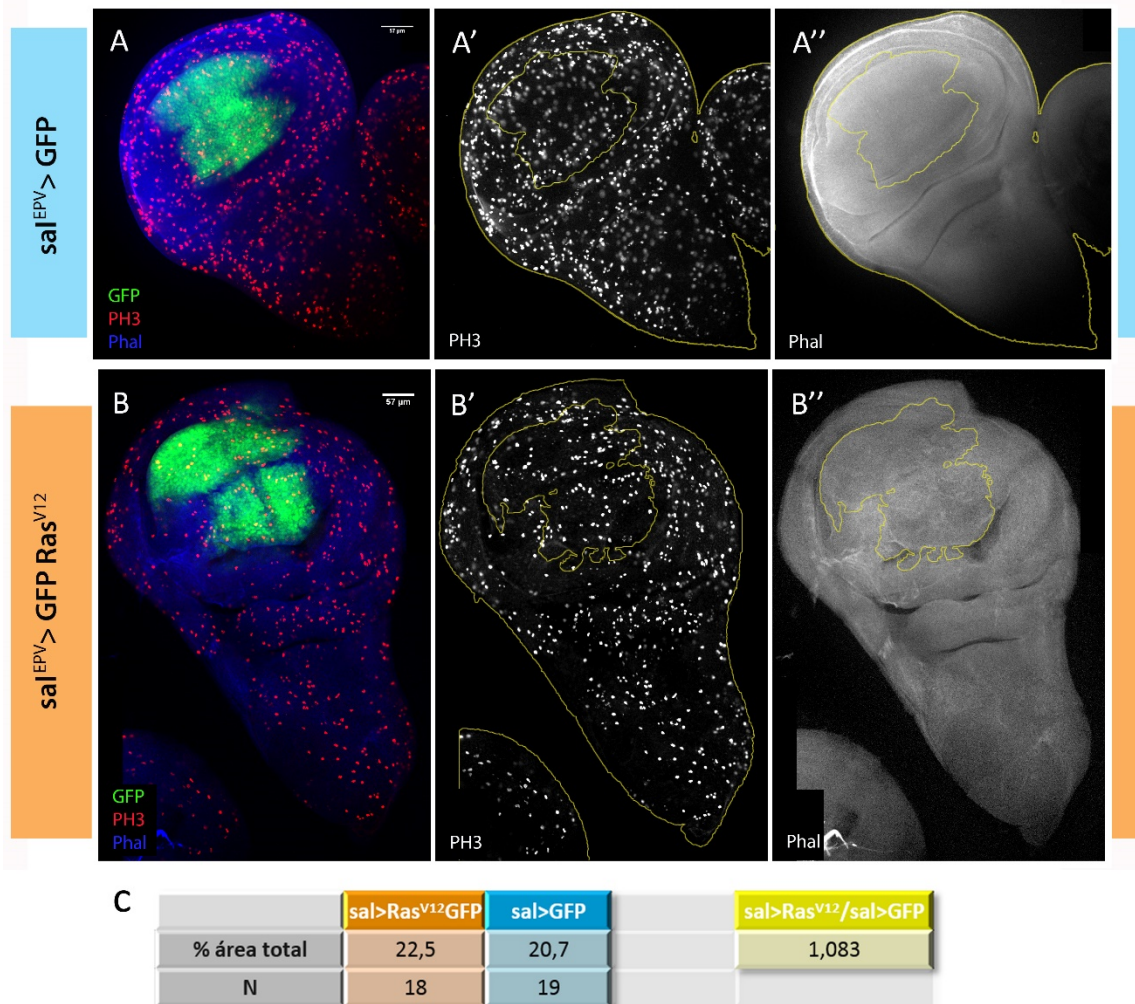


**Figura R2.** La activación constitutiva de Ras en clones no afecta a los niveles de proliferación, incrementa los niveles de dMyc y no afecta a la vía de Hippo. Discos imaginales de ala con clones generados mediante el sistema MARCM marcados en verde (GFP). Los genotipos son: **(A y C)** Clones *ras<sup>V12</sup>*: *yw*, *hs-Flp*, *tub-Gal4*, *UAS-GFP*; *arm-LacZ*, *FRT40A* / *tub-Gal80*, *FRT40A*; *UAS-ras<sup>V12</sup>* + **(B y D)** Clones neutros (control): *yw*, *hs-Flp*, *tub-Gal4*, *UAS-GFP*; *arm-LacZ*, *FRT40A* / *tub-Gal80*, *FRT40A*. **(A, B)** Discos con clones de 96h AHS marcados para dMyc en rojo y para PH3 (células en fase M del ciclo celular) en azul. Compárese **(B)** los clones *ras<sup>V12</sup>* con **(A)** clones neutros (control). Apréciase que los niveles de dMyc están incrementados de manera autónoma celular en el borde de los clones *ras<sup>V12</sup>* que aparecen en el “wing pouch”, mientras que no varían con respecto a las células silvestres circundantes en clones de otras regiones del disco. Además, el nivel de proliferación (PH3), no se incrementa en los clones *ras<sup>V12</sup>*. **(C, D)** Discos de 72h AHS marcados para Yorkie (Yki) en rojo y TOPRO en azul. Tanto en **(C)** los clones *ras<sup>V12</sup>* como en **(D)** los clones neutros, Yki presenta localización citoplasmática indicando que la vía de Hippo no se activa en respuesta al a activación de la vía Ras.



células detenidas en fase G2. El acúmulo de material genético dentro de estas células retenidas en la fase G2, sería el responsable último del incremento de tamaño de las células *ras<sup>V12</sup>*.

Analizamos los niveles de la proteína dMyc mediante tinción inmuno-histoquímica en nuestros clones y también observamos la activación autónoma de dMyc, aunque esta activación no se da de manera homogénea



**Figura R3.** La activación constitutiva de la vía Ras no afecta a los niveles de proliferación celular ni al tamaño de los dominios de expresión *sal<sup>EPV</sup> > ras<sup>V12</sup>*. Discos imaginales que poseen la construcción *sal<sup>EPV</sup>* cuyo dominio de expresión está marcado en verde (GFP), teñidos para PH3 (proliferación) en rojo y Faloidina (Phal) en azul (contorno celular). **(A)** Discos con un dominio *sal* neutro (*sal<sup>EPV</sup> > GFP*) con genotipo *w*; *sal<sup>EPV</sup>*, UAS-GFP/+; UAS-GFP/+. **(B)** Discos en los que se expresa *ras<sup>V12</sup>* en el dominio *sal* (*sal<sup>EPV</sup> > GFP ras<sup>V12</sup>*) con genotipo *w*; *sal<sup>EPV</sup>*, UAS-GFP/+; UAS-*ras<sup>V12</sup>* /+. Compárese el nivel de proliferación y el tamaño de los dominios *sal<sup>EPV</sup>*. No se observa ninguna diferencia en el número de células marcadas para PH3 entre experimento y control. A simple vista, no se aprecian diferencias en el tamaño del área de los dominios *sal<sup>EPV</sup>*. **(C)** Tabla en la que aparece representada la medida del % del área del disco que ocupa el dominio marcado por GFP en *sal<sup>EPV</sup> > GFP ras<sup>V12</sup>* y en los controles *sal<sup>EPV</sup> > GFP*. La relación entre ambas medidas es prácticamente 1 (1,083), lo cual indica la activación constitutiva de la vía Ras en el

dentro de todo el clon (**Figura R2. A y B**). Para explicar detalladamente este resultado, previamente voy a hacer una descripción anatómica de disco imaginal de ala. Podemos subdividir el disco de ala en tres regiones amplias (**Ver figura R4. A**): la región presuntiva de ala ("pouch"), definida externamente por el "anillo" de expresión de Wg, constituye el área más proximal del disco; la región presuntiva de la axila alar ("hinge"), abarca desde el anillo de Wg hasta el borde distal del disco, describiendo un área en circunferencia alrededor del "pouch" y la región presuntiva de torax ("notum"), que conforma el área del disco en forma triangular más distal (inferior en la figura). La proteína dMyc se expresa en todas las células del disco, pero presenta niveles más elevados dentro del "pouch", en un patrón de expresión complementario al de Wg. Encontramos niveles incrementados de dMyc en los bordes de los clones originados en el "pouch"; sin embargo, no encontramos diferencias en los niveles de dMyc dentro de los clones que aparecen en la región presuntiva de la axila alar (hinge) o en la región presuntiva de torax (notum), regiones que presentan niveles más bajos de dMyc en un disco silvestre. Este incremento en los niveles de proteína dMyc también puede apreciarse en un contexto  $sal^{EPV} > GFP \text{ } ras^{V12}$  (**Figura R4**). Está descrito que los niveles de dMyc son regulados por Wg y Notch (Herranz et al. 2008) cerca del borde D/V. La expresión de  $ras^{V12}$  dentro del dominio  $sal^{EPV}$  produce una ligera disminución de los niveles de expresión silvestre de Wg en el borde D/V, probablemente debido al incremento de los niveles de dMyc. En conjunto estos resultados sugieren que el

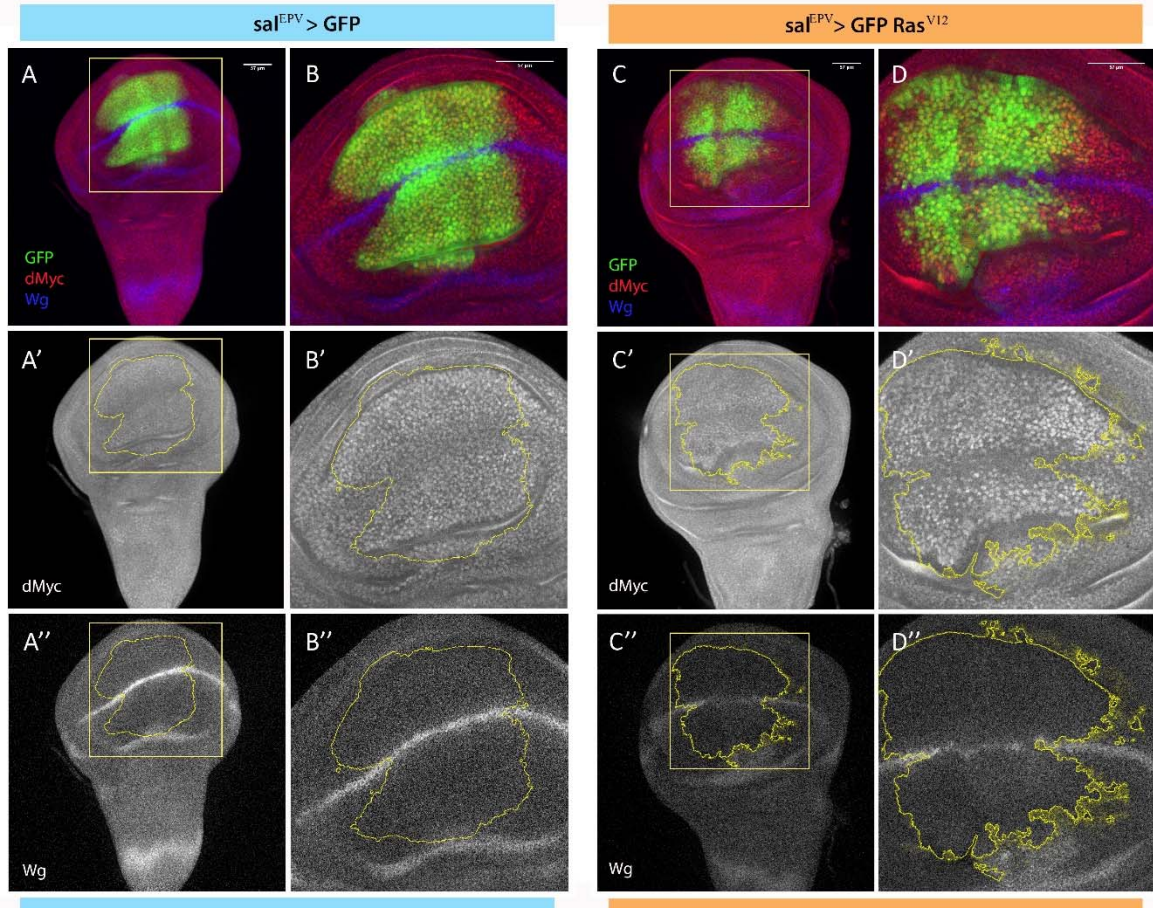
aumento de tamaño de los clones  $ras^{V12}$  se debe al incremento del volumen celular, corroborando los resultados encontrados por Prober y Edgar.

En *Drosophila*, la inhibición de la vía de Hippo está asociada a sobre-crecimientos hiperplásicos (Huang et al. 2005). El núcleo principal de la vía está formado por las proteínas kinasas Hippo (Hpo), Salvador (Sav) y Warts (Wts). Las dos primeras fosforilan a Wts que a su vez fosforila al cofactor transcripcional Yorkie (Yki) impidiendo su translocación al núcleo (Huang et al. 2005). Cuando Yki no es fosforilado se transloca del citoplasma al núcleo y ahí, junto con el cofactor Scalloped (Sd), promueve la transcripción de genes promotores del crecimiento e inhibidores de la apoptosis, como cycE, Diap1, Bantam micro-RNA y dMyc (Goulev et al. 2008; Wu et al. 2008; Zhang et al. 2008). Cuando la vía Hippo está activa, Yki es fosforilado es citoplasmático. Por el contrario, cuando la vía está inhibida, la translocación de Yki al núcleo promueve crecimiento. Analizamos la activación de la vía Hippo mediante inmunotinción con un anticuerpo que reconoce Yki. En todos los casos observamos que la proteína Yki es citoplasmática, tanto en los clones  $ras^{V12}$  como en los clones neutros y no observamos ninguna diferencia con las células silvestres, con lo que la vía Hippo está activa dentro de estas células (**Figura R2. C y D**). La activación constitutiva de la vía Ras no induce la inhibición de la vía de Hippo.

A modo de resumen de estos dos apartados: las células  $ras^{V12}$  presentan propiedades diferentes de adhesión con las

células silvestres y son extruidas del epitelio formando vesículas con forma redondeada pero sin perturbar la estructura monocapa del epitelio del disco propio del disco imaginal de ala y, aunque incrementa ligeramente el tamaño de las células y los niveles de dMyc, no presentan

variaciones en la tasa proliferativa respecto al tejido silvestre. Por tanto, se puede considerar que los clones de células *ras<sup>V12</sup>* no manifiestan un fenotipo hiperplásico, confirmando las observaciones de (Prober and Edgar 2000).



**Figura R4. Activación de dMyc y del morfógeno Wg en los dominios  $sal^{EPV} > ras^{V12}$ .** Discos imaginales de ala que poseen la construcción  $sal^{EPV}$  cuyo dominio de expresión está marcado en verde (GFP), teñidos para dMyc en rojo y para Wingless (Wg) en azul. Los genotipos de las larvas son (A y B)  $sal^{EPV} > GFP$ ; w;  $sal^{EPV}$ , UAS-GFP/+; UAS-GFP/+ y (C y D)  $sal^{EPV} > GFP$   $Ras^{V12}$ ; w;  $sal^{EPV}$ , UAS-GFP/+; UAS-*ras<sup>V12</sup>* /+. (B) Detalle de la región recuadrada en el panel A. (D) Detalle de la región recuadrada en el panel C. Compárese los niveles de expresión de dMyc así como de la proteína difusible Wg. Puede apreciarse un incremento en los niveles de dMyc, así como una disminución de los niveles de expresión silvestre de Wg (en el borde D/V) dentro del dominio  $sal^{EPV} > GFP$   $Ras^{V12}$ , respecto a los silvestres.



## Linaje celular del tejido $sal^{EPV}>ras^{V12}$

También analizamos las posibles diferencias de tamaño en el tejido imaginal de ala expresando  $ras^{V12}$  en el dominio  $sal^{EPV}$  ( $sal^{EPV}>GFP\ ras^{V12}$ ) y comparándolo con el tamaño del dominio  $sal^{EPV}$  que expresa solo GFP ( $sal^{EPV}>GFP$ ). Se diseccionaron, fijaron y tiñeron estas larvas al alcanzar el tercer estadio tardío y se analizaron al microscopio confocal. Se midió el área del dominio  $sal^{EPV}$  en cada genotipo, normalizada respecto al área total del correspondiente disco imaginal. La media del porcentaje (%) del área total del disco ocupada por GFP en el caso del dominio silvestre es de 20,7% (n=19) y en el caso de dominio expresando  $ras^{V12}$ , es de 22,5%. (n=18); la relación entre las áreas es prácticamente 1 (1,083) (**Figura R3.C**), indicando que no existe una variación en el tamaño del dominio  $sal^{EPV}>GFP\ ras^{V12}$ . Es posible que seamos incapaces de detectar diferencias de tamaño de los dominios  $sal^{EPV}$  debido al carácter “abierto” (sin restricción de linaje) del dominio en el que dirige la expresión de  $ras^{V12}$ . Y dado que no existe diferencia en el índice mitótico (**Figura R3. A y B**) respecto al tejido silvestre y tampoco existen diferencias en el área de los dominios, decidimos marcar el linaje celular del dominio para comprobar si había algún tipo de crecimiento o movimiento de estas células.

Para detectar los eventuales cambios de posición de las células, que en algún momento del desarrollo han expresado  $ras^{V12}$ , aunque en el momento de la fijación hayan perdido la expresión de la línea Gal4, utilizamos un *cassette* de marcaje de linaje,

$act5C>stop>LacZ$ , y una construcción UAS-Flp, de forma que todas las células que en algún momento del desarrollo larvario hubieran tenido  $sal^{EPV}$  activo, quedarían marcadas de manera indeleble y heredable por la expresión del gen que produce la  $\beta$ -Galactosidasa (LacZ) (Ver el apartado correspondiente de Materiales y Métodos). Los genotipos de las larvas utilizadas son:  $w$ ,  $sal^{EPV}$ , UAS-GFP;  $act5C>stop>lacZ$ , UAS-Flp/ + para los controles (abreviado como  $sal^{EPV}>GFP\ Flp$ ;  $act>stop>LacZ$ ) y  $w$ ,  $sal^{EPV}$ , UAS-GFP/+;  $act5C>stop>lacZ$ , UAS-Flp/ UAS- $ras^{V12}$  para los experimentales (abreviado como  $sal^{EPV}>GFP\ ras^{V12}\ Flp$ ;  $act>stop>LacZ$ ). Del mismo modo que en el experimento anterior, dejamos que las larvas llegaran hasta el tercer estadio tardío, las diseccionamos, fijamos y teñimos con el anticuerpo anti- $\beta$ -Galactosidasa ( $\beta$ -Gal) para detectar a las células que expresan LacZ. En el caso del experimento  $sal^{EPV}>GFP\ ras^{V12}\ Flp$ ;  $act>stop>LacZ$  observamos que existían células contiguas al dominio marcado por GFP que tenían marca de linaje (lacZ). Realizamos medidas de las áreas de los dominios marcados por GFP y del linaje marcado con  $\beta$ -Galactosidasa. Las células marcada por GFP expresan el linaje del dominio en el momento de la fijación; mientras que las células marcadas por  $\beta$ -Gal, el linaje de todas aquellas células que en algún momento del desarrollo han expresado  $sal^{EPV}$ . En cada caso sustraemos a la medida del área LacZ la medida del área GFP y tenemos una medida del área marcada por linaje originado en el dominio  $sal^{EPV}$  que se ha movido. El resultado de este experimento revela que existe una contribución por parte de las células que en algún momento

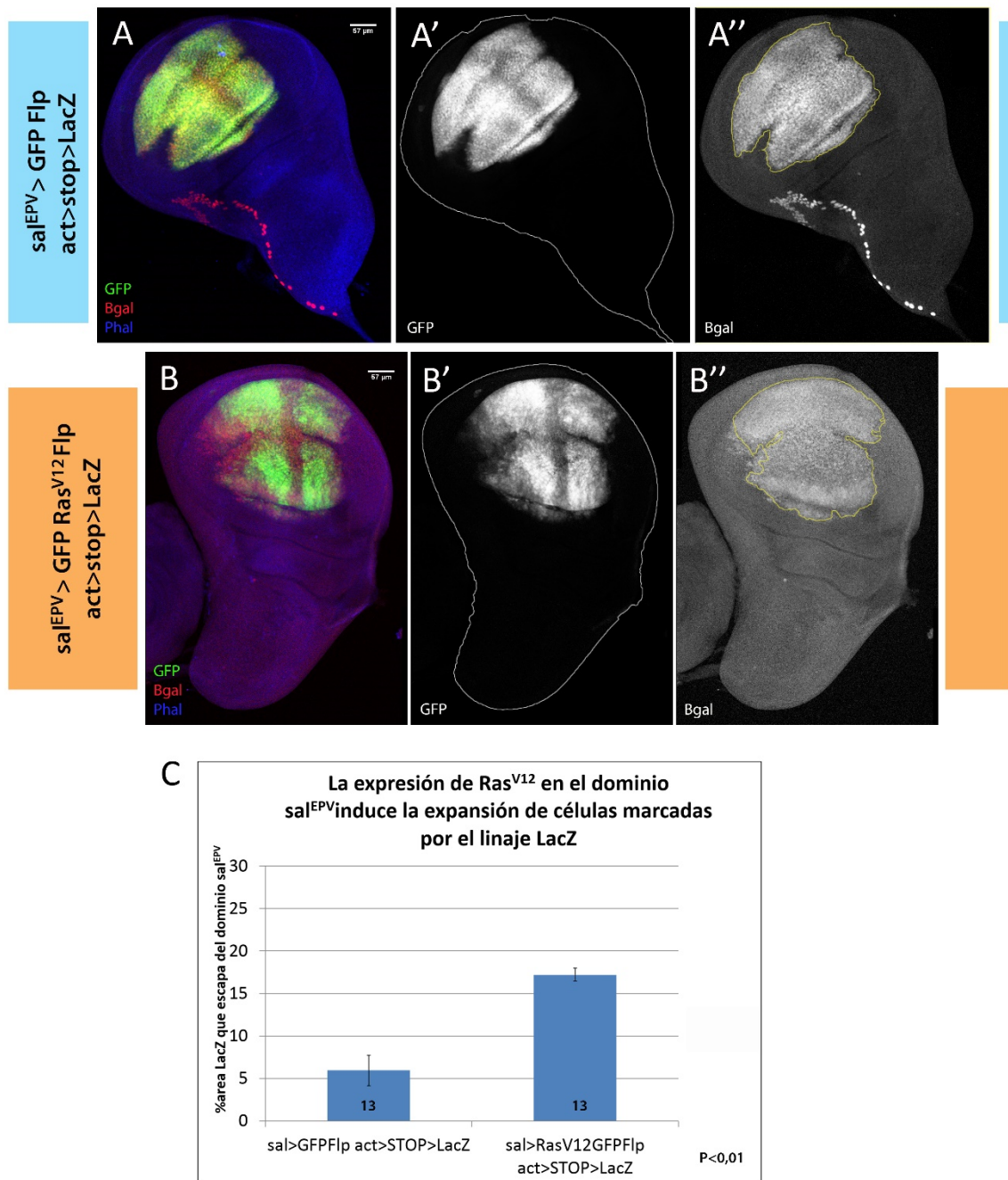
han expresado *ras*<sup>V12</sup> para formar el tejido adyacente al dominio marcado con GFP, concretamente, el 17% (n=13) del tejido marcado por linaje “se escapa” del área marcada por GFP en el experimento *sal*<sup>EPV</sup> > GFP *ras*<sup>V12</sup> Flp; act>stop>LacZ, mientras que en los controles “neutros” *sal*<sup>EPV</sup> > GFP Flp; act>stop>LacZ tan sólo un 5% (n=13) del tejido marcado por β-galactosidasa no expresa en ese momento GFP. Esta diferencia además tiene una significación elevada (P<0,01) (**Figura R5**). El dominio *sal* viene determinado por los niveles de Dpp. Los niveles Omb en el disco de ala, una diana molecular de Dpp, no varían respecto a una situación silvestre al expresar *ras*<sup>V12</sup> mediante la línea *sal*<sup>EPV</sup> (no mostrado), indicando de manera indirecta que la expresión de *ras*<sup>V12</sup> en este contexto no afecta a los niveles de expresión de Dpp. Por tanto, si las células son más grandes, y la extensión del dominio *sal* es similar, es normal que algunas células que al principio expresaban Gal4 (y por tanto *ras*<sup>V12</sup>, lacZ y GFP), porque estaban a la distancia adecuada del borde A/P, ahora (al final del tercer estadio larvario) queden más lejos y no expresen Gal4 ni GFP. Una explicación alternativa podría ser que la activación constitutiva de la vía Ras indujera la motilidad de estas células.

#### - La mutación *ras*<sup>V12</sup> no induce super-competición celular

Se ha descrito que la expresión de una forma activa de *ras* induce la apoptosis de células silvestres localizadas a varios diámetros celulares de la célula mutante (Karim and Rubin

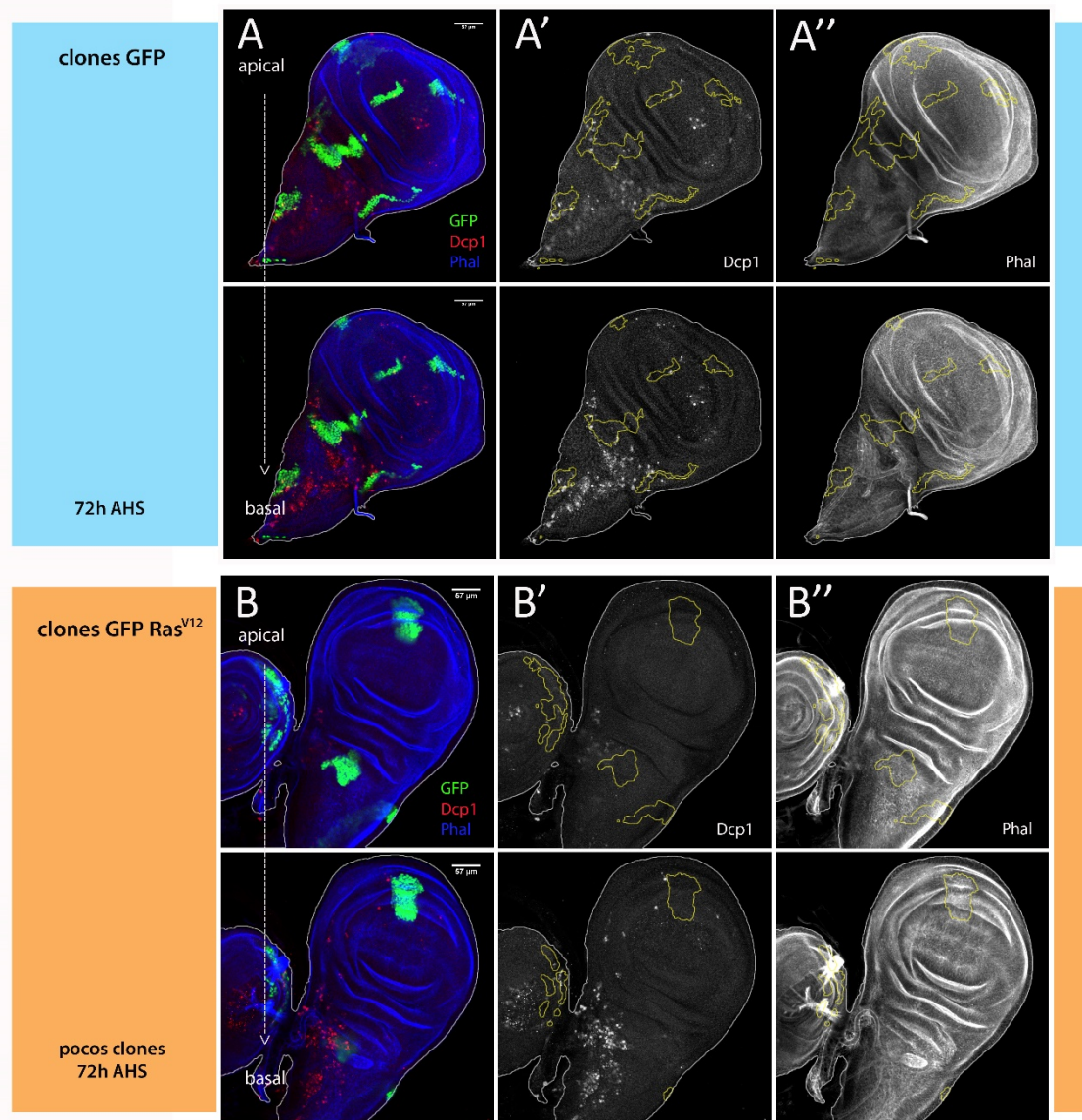
1998), sugiriendo que una activación sostenida de la vía de las MAPK induce super-competición (revisado en Amoyel and Bach 2014). Estas conclusiones se extraen de un experimento en el que se dirige la expresión de *ras*<sup>V12</sup> en el borde antero-posterior mediante el “driver” *dpp*-Gal4. Esta región se considera un centro organizador del tejido y los efectos que se observan podrían deberse a la expresión de esta forma activa de *ras* en esta región particular. El motivo por el que se produce apoptosis no se conoce. En discos imaginales con clones *ras*<sup>V12</sup> de diferentes tamaños hemos llevado a cabo un análisis de marcadores apoptóticos. Hemos utilizado marcaje con el reactivo TUNEL, que reconoce extremos rotos de DNA y se une a ellos. Además se ha utilizado un anticuerpo que reconoce la caspasa efectora de *Drosophila* Dcp1. Ambos marcajes, TUNEL y antiDCP1 son coincidentes, lo que valida estos métodos de detección. En los discos control con clones neutros, aparecían marcadas un grupo de células en la región presuntiva del “notum” más cercana al “hinge”. Se trata de las células adepiteliales, que no pertenecen al epitelio pseudo-estratificado del disco propio. En nuestros experimentos también detectamos estas células (**Figura R6**). Observamos que la activación constitutiva de la vía Ras en clones de pequeño tamaño (de unas 50 células) no induce apoptosis de manera no-autónoma, apenas se observan células apoptóticas en el tejido. Esto ocurre tanto cuando existen en el tejido unos pocos clones como cuando existe un gran número de ellos (**Figura R6.B y R6.C**).





**Figura R5.** La expresión de  $ras^{V12}$  en el dominio  $sal^{EPV}$  induce la motilidad de estas células. (A, B) Discos imaginales que poseen la construcción  $sal^{EPV}$  cuyo dominio de expresión está marcado en verde (GFP) y en los que hemos marcado el linaje celular mediante la construcción UAS-Flp y el *cassette*  $act5C > stop > LacZ$ . La ganancia del gen LacZ, que codifica para la proteína de levadura  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ gal) es irreversible y heredable para todas las células que en algún momento del desarrollo hayan pertenecido al dominio  $sal^{EPV}$ . Los discos están teñidos para  $\beta$ gal (Linaje-LacZ) en rojo y para Phal en azul (contorno celular). El genotipo de las larvas utilizadas es (A)  $sal^{EPV} > GFP$  (control); w;  $sal^{EPV}$ , UAS-GFP;  $act5C > stop > lacZ$ , UAS-Flp/ + y (B)  $sal^{EPV} > GFP \text{ ras}^{V12}$ ; w;  $sal^{EPV}$ , UAS-GFP/+;  $act5C > stop > lacZ$ , UAS-Flp/ UAS- $ras^{V12}$ . Compárese la marca de linaje que pierde la expresión del GFP entre A y B. (C) Representación gráfica del % área del disco marcada por linaje pero no por GFP. Obsérvese que en un disco  $sal^{EPV} > GFP$  esta área representa un 5% mientras que en un disco  $sal^{EPV} > GFP \text{ ras}^{V12}$  asciende al 17%. Valores de N (tamaño muestral) representados numéricamente en cada barra del gráfico.

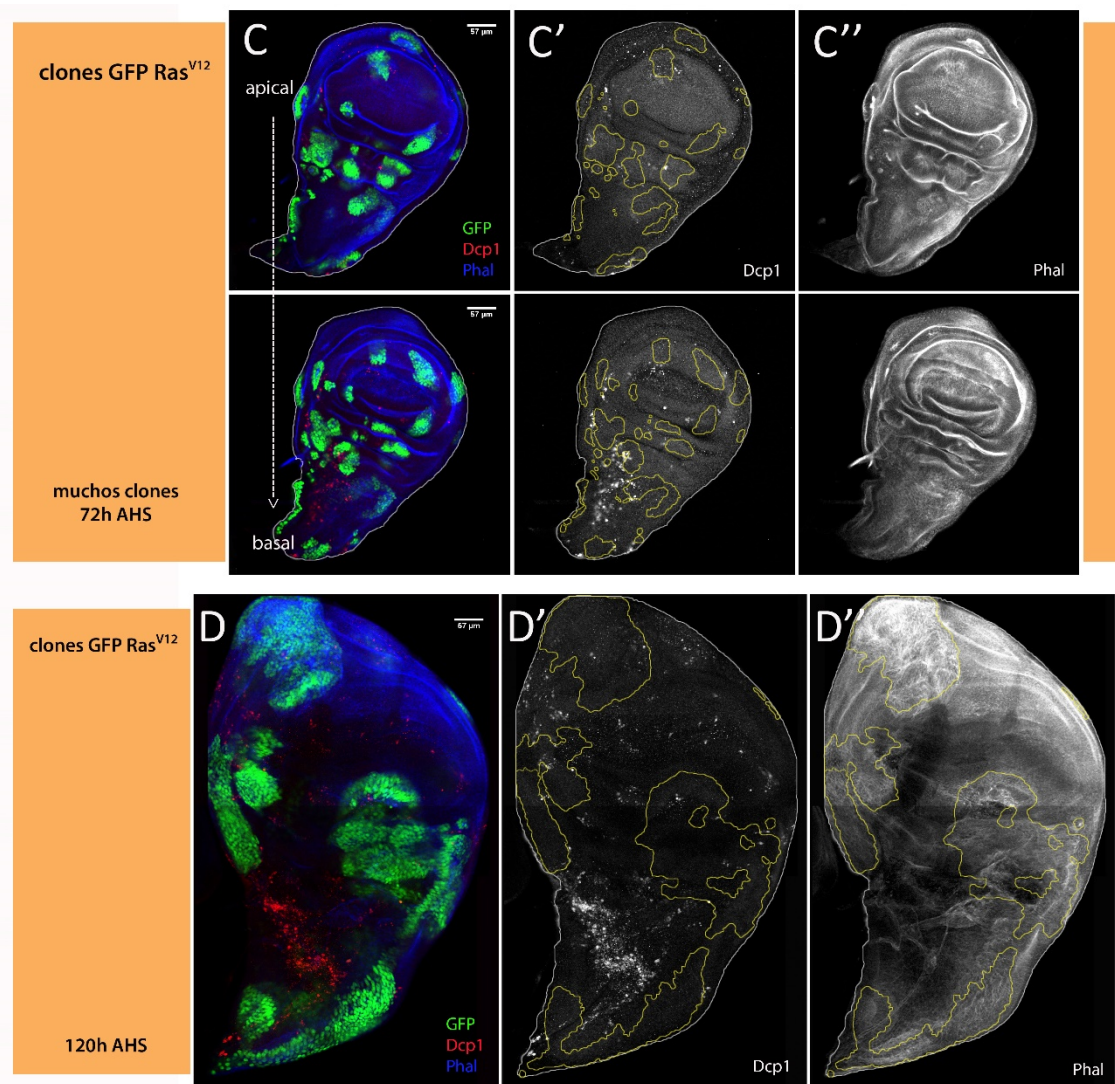




**Figura R6. La expresión de  $ras^{V12}$  en clones no induce apoptosis.** Discos imaginales con clones marcados en verde (GFP), teñidos para Dcp1 (caspasa efectora de *Drosophila*) en rojo y Phal en azul (contorno celular). **(A)** Disco con clones neutros (control) cuyo genotipo es *yw*, *hs-Flp*, *tub-Gal4*, *UAS-GFP*; *arm-LacZ*, *FRT40A* / *tub-Gal80*, *FRT40A*. **(B, C y D)** Discos con clones  $ras^{V12}$  cuyo genotipo es *yw*, *hs-Flp*, *tub-Gal4*, *UAS-GFP*; *arm-LacZ*, *FRT40A* / *tub-Gal80*, *FRT40A*; *UAS-ras<sup>V12</sup>* / +. **(A, B y C)** Discos fijados a las 72h después de la inducción de los clones (72h AHS), con clones pequeños. (Continúa en la página siguiente)

Cuando expresamos  $ras^{V12}$  en una región más amplia de tejido, como el dominio  $sal^{EPV}$  ( $sal^{EPV} > GFP \text{ } ras^{V12} \text{ Flp}; act > stop > LacZ$ ), observamos tan sólo un pequeño grupo de células apoptóticas (4-6 células) siempre

asociado al borde anterior del dominio  $sal^{EPV}$  (Figura R7) y nunca en un número tan abundante como en el trabajo de (Karim and Rubin 1998).

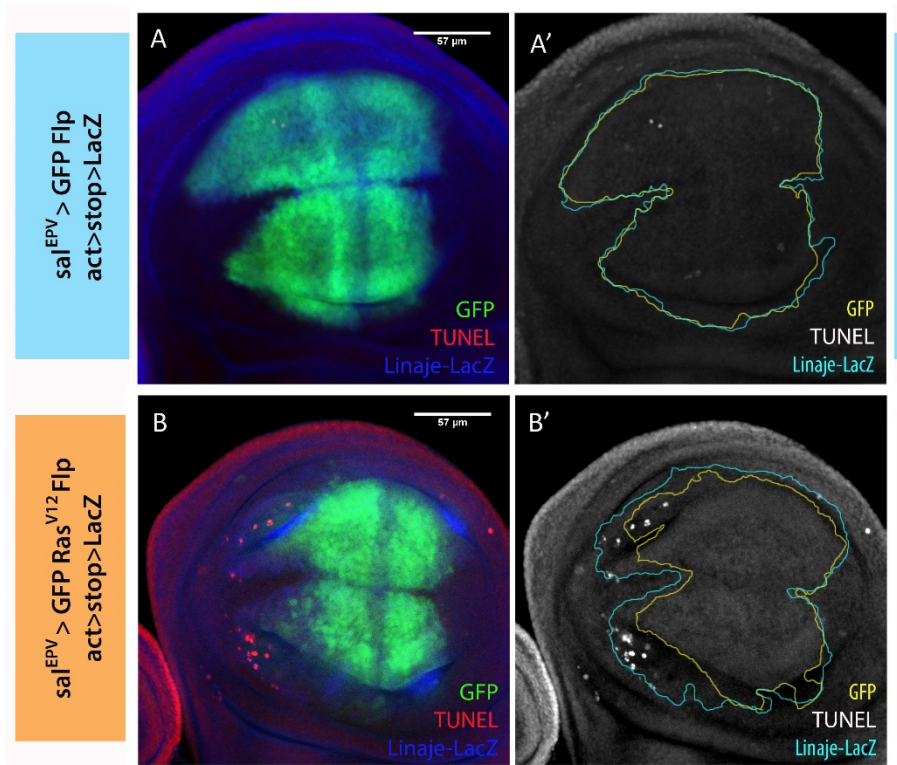


(D) Disco fijado a las 120h AHS con clones de mayor tamaño. Obsérvese que en todos los casos, incluidos los controles, aparece un grupo de células marcadas para Dcp1 en la región anterior del notum. Se trata de las células adhepiteliales que no pertenecen al disco propio. En los discos con clones *ras*<sup>V12</sup> pequeños (B y C) no detectamos activación de apoptosis, ni cuando hay pocos clones por disco (B), ni cuando hay muchos clones (C). Cuando los clones presentes en el tejido son de gran tamaño (D), aparecen algunas células apoptóticas en el tejido imaginal, pero no de manera significativa. Podemos considerar que la activación constitutiva de Ras en clones no induce super-competición en el tejido imaginal.

De manera análoga, cuando generamos clones *ras*<sup>V12</sup> de mayor tamaño, se observa tan sólo cierta cantidad de apoptosis en el tejido silvestre que separa a estos clones cuando estos se encuentran separados por unos pocos diámetros celulares (Figura R6.D).

Concluimos de estos experimentos que la activación constitutiva de la vía Ras en el tejido imaginal no genera apoptosis de forma no-autónoma, por tanto no puede afirmarse que la activación sostenida de la vía induzca super-competición celular como se ha propuesto por Amoyel and Bach 2014.





**Figura R7. La expresión de *ras*<sup>V12</sup> en dominios *sal*<sup>EPV</sup> no induce apoptosis.** Discos imaginales que poseen la construcción *sal*<sup>EPV</sup> cuyo dominio de expresión está marcado en verde (GFP) y en los que hemos marcado el linaje del dominio utilizando una construcción UAS-Flp y el *cassette* de marcaje de linaje *act5C>stop>LacZ*. Los discos están teñidos con TUNEL en rojo (células apoptóticas) y con βgal en azul para (Linaje-LacZ). El genotipo de las larvas es (A) *sal*<sup>EPV</sup> > GFP (control); w; *sal*<sup>EPV</sup>, UAS-GFP; *act5C>stop>lacZ*, UAS-Flp/+ y (B) *sal*<sup>EPV</sup> > GFP *Ras*<sup>V12</sup>; w; *sal*<sup>EPV</sup>, UAS-GFP/+; *act5C>stop>lacZ*, UAS-Flp/+ UAS-*ras*<sup>V12</sup>. Observamos que la expresión de *ras*<sup>V12</sup> induce la muerte de manera no-autónoma en un pequeño grupo de células (4-6 células) en el margen anterior del dominio *sal*<sup>EPV</sup>, estas células tienen el linaje marcado aunque han perdido GFP.

## 2.- Señales necesarias para la transformación: la apoptosis inducida irradiación

Wu et al. 2010 publicaron que el potencial de crecimiento de las células *ras*<sup>V12</sup> en el disco de ojo está dramáticamente estimulado por la presencia en el mismo disco de clones adyacentes mutantes para el TSG *scrib*. Estos autores se refieren a este fenómeno como cooperación interclonal entre las células *scrib* y las células *ras*<sup>V12</sup>, lo cual causa la activación de la vía JNK y la subsecuente activación de la vía JAK/STAT, la cual promueve proliferación y tumorigenesis. Los clones *scrib* son eliminados

del tejido por apoptosis y se sabe que las células apoptóticas secretan señales mitogénicas (Perez-Garijo et al. 2004; Ryoo et al. 2004). Esto nos sugirió que la apoptosis podría ser la fuerza promotora del potencial tumorigénico de las células *ras*<sup>V12</sup>. Hay evidencia de que la actividad mitogénica de las células apoptóticas está mediada por la activación de la vía JNK que, directa o indirectamente, activa la secreción de los mitógenos Wg y Dpp (Perez-Garijo et al. 2004; Ryoo et al. 2004).

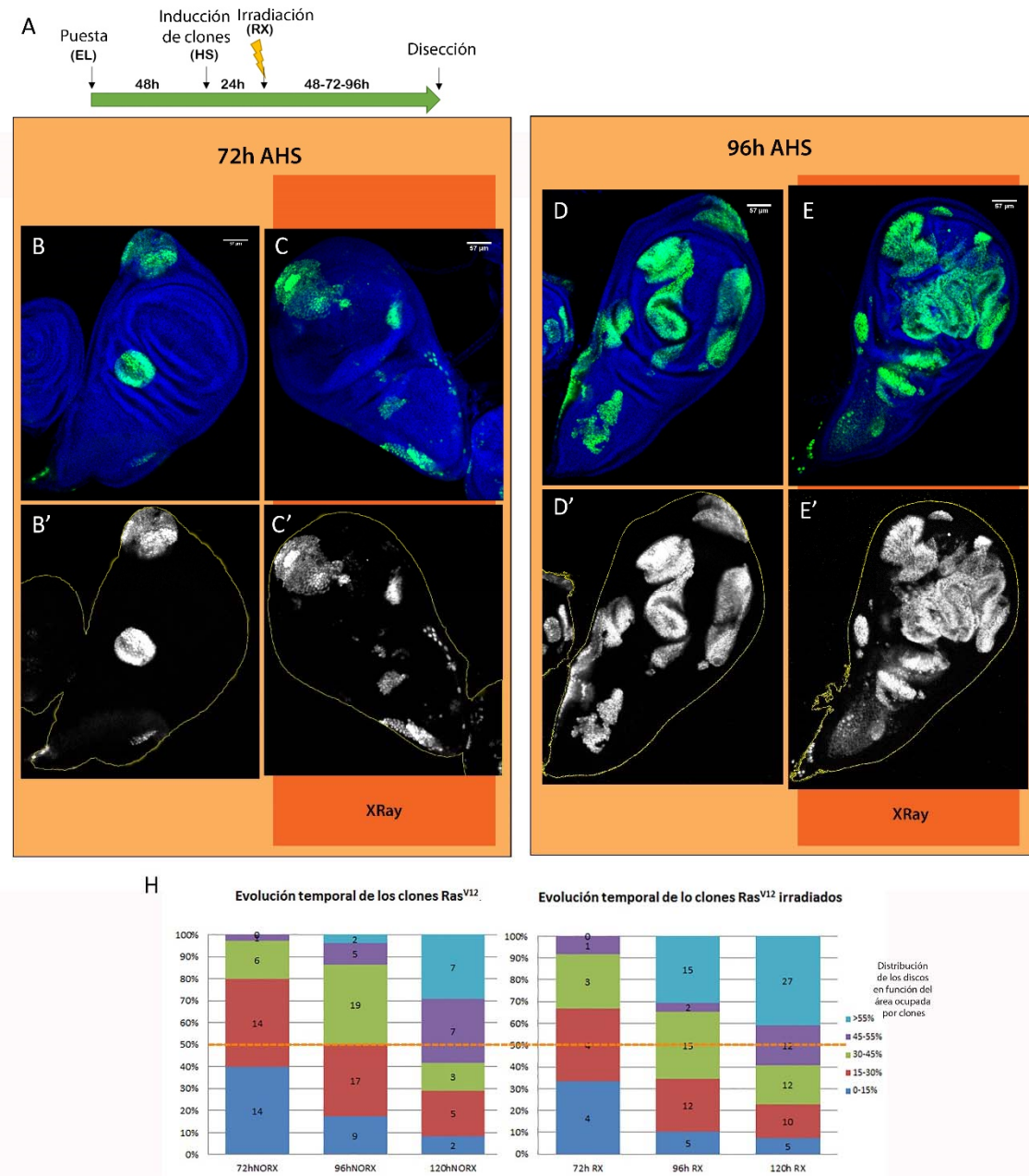
Diseñamos entonces un tipo de experimentos en los que teníamos un tejido mosaico formado por células *ras<sup>V12</sup>* (clones mutantes o bien expresado en el dominio *sal<sup>EPV</sup>*) y células silvestres, sobre el cual inducíamos apoptosis masiva para poder estudiar la respuesta de las células *ras<sup>V12</sup>*. El método elegido para inducir grandes cantidades de apoptosis fue la irradiación con rayos-X en una dosis muy elevada (3000R), que induce la muerte de más del 50% de las células del disco (Haynie and Bryant 1977).

#### - Respuesta de los clones *ras<sup>V12</sup>* a una dosis elevada de irradiación

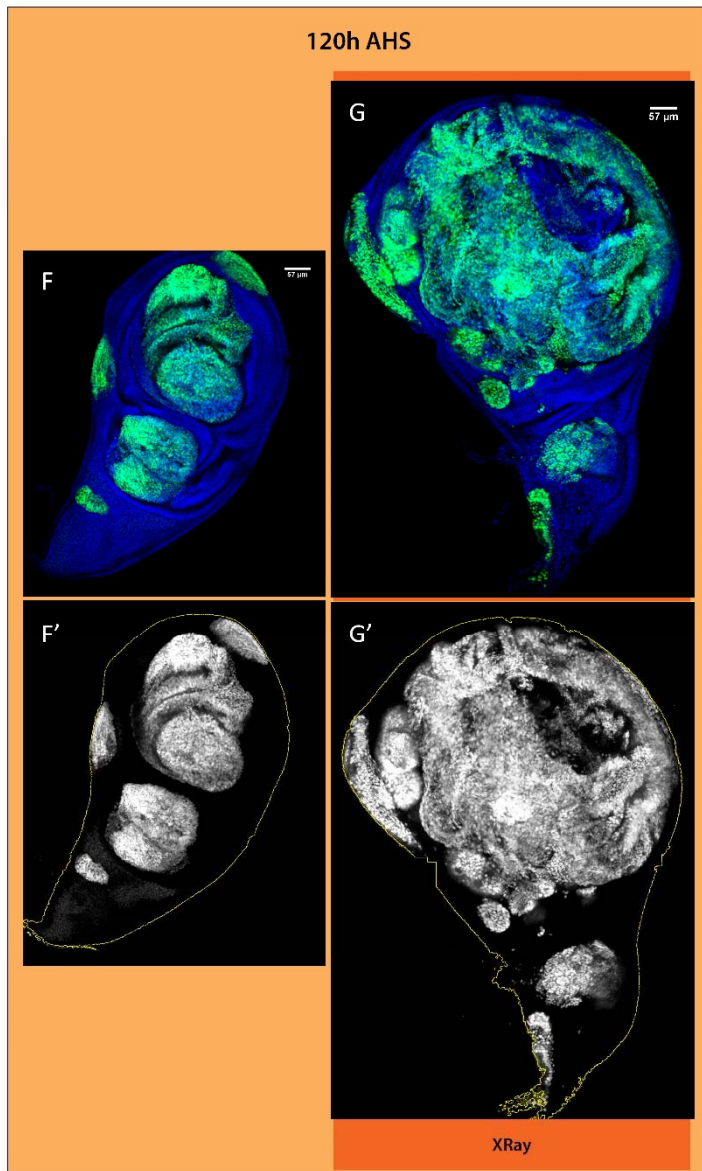
En primer lugar (Ver Material y Métodos, Figura M4), hacemos dos puestas en paralelo de cruces homólogos para obtener larvas del genotipo adecuado (*yw*, *hs-Flp*, *tub-Gal4*, *UAS-GFP*; *arm-LacZ*, *FRT40A* / *tub-Gal80*, *FRT40A*; *UAS-ras<sup>V12</sup>* / +) y 48h después de la puesta ("After Egg Laying", AEL) inducimos la formación de clones *ras<sup>V12</sup>*, mediante un choque térmico ("Heat Shock", HS) de 15' a 37°C. Para asegurarnos de tener clones de un cierto tamaño, dejamos desarrollar las larvas durante 24h y sometemos a una de las puestas a una dosis alta de irradiación (3000R) con rayos X (RX). Dejamos que estos clones evolucionen y fijamos las larvas a distintos tiempos tras el tratamiento de irradiación ("After X-Radiation", ARX), 48-72-96h ARX junto con larvas control de la misma edad, una vez que habían alcanzado el tercer estadio larvario tardío. De este modo podíamos hacer una comparación entre el tamaño relativo de los clones en cada caso (Figura R8. A).

Como se puede apreciar en las imágenes, tomadas todas con los mismos aumentos del microscopio confocal (nótese que la escala de las imágenes es la misma), la irradiación tiene un efecto en el tamaño y la forma de los clones *ras<sup>V12</sup>* (Figura R8. B-G). A las 72h después de la inducción de los clones (72h AHS) y, por tanto, 48h tras la irradiación (48h ARX) en el caso experimental, los clones de discos irradiados (RX) tienen un tamaño similar al de los controles sin irradiar. Los bordes de los clones de discos RX, sin embargo, aparecen más disgregados y menos redondeados que los que presentan los controles. Sin embargo, 96h AHS (72h ARX) las diferencias de tamaño de los clones son más apreciables: los clones de los discos RX aparecen más grandes, en muchos casos por haberse producido la fusión con otros clones próximos. Se puede apreciar en la tinción nuclear con TOPRO, que los discos presentan un incremento en el número de pliegues del epitelio respecto a los discos NO RX. A las 120h AHS (96h ARX) se incrementa el número de discos que presentan mayor tamaño y con clones notablemente más grandes que los controles. Para cuantificar las diferencias de tamaño hemos estudiado la evolución temporal de las poblaciones de discos con clones de cada caso, atendiendo a las proporciones del área total de cada disco ocupada por clones *ras<sup>V12</sup>*, que están marcados en verde por GFP (Figura R8.H). Las mediciones se han realizado sobre las imágenes bidimensionales tomadas al microscopio confocal, calculando el área ocupada por clones marcados por GFP respecto

## RESULTADOS



**Figura R8. Una dosis alta de irradiación con rayos X (3000R) induce el sobrecrecimiento de los clones  $ras^{V12}$**  (A) Esquema del desarrollo del experimento. En puestas de cruces homólogos en paralelo inducimos la formación de clones  $ras^{V12}$ , mediante el sistema MARCM, 48h después de la puesta ("Egg Laying", EL) mediante un choque térmico ("Heat Shock", HS) de 15' a 37°C y 24h más tarde sometemos a una de las puestas a una dosis alta de irradiación (3000R) con rayos X (RX). Fijamos las larvas a distintos tiempos tras el tratamiento de irradiación ("After X-Radiation", ARX), 48-72-96h ARX junto con larvas control de la misma edad, una vez que han alcanzado el tercer estadio tardío del desarrollo larvario. (B-G) Discos de ala con clones  $ras^{V12}$  marcados en verde (GFP) fijados a diferentes tiempos tras la inducción de los clones y teñidos con TOPRO (núcleos celulares). El genotipo de las larvas en todos los casos es: *yw*, *hs-Flp*, *tub-Gal4*, *UAS-GFP*; *arm-LacZ*, *FRT40A* / *tub-Gal80*, *FRT40A*; *UAS-ras<sup>V12</sup>* / +. Nótese que la escala de todas las imágenes es la misma y se representan sin igualar el tamaño para que puedan apreciarse de un vistazo las variaciones en el tamaño inducidas por efecto de la irradiación. (B, D, F) Fenotipo de los clones  $ras^{V12}$  sin irradiar. (NO RX).



(C, E, G) Fenotipo de los clones *ras<sup>V12</sup>* irradiados (RX). Nótese que a las 72h AHS y, por tanto, 48h ARX, apenas hay diferencia en el tamaño de los clones. Los bordes de los (C) clones de discos RX sin embargo aparecen más disgregados y menos redondeados que los (B) clones de discos NO RX. Sin embargo, 96h AHS (72h ARX) los (E) clones de los discos RX aparecen más grandes y con mayor cantidad de pliegues que los (D) clones de los discos NO RX. Y a las 120h AHS (96h ARX) se incrementa notablemente el tamaño de (G) los clones y de los discos RX respecto del de los (F) NO RX. Nótese el gran número de pliegues que se originan en el epitelio (G'), cuya medida del área en una imagen bidimensional va a subestimar. (H) Representación gráfica de la evolución temporal de las poblaciones de discos con clones *ras<sup>V12</sup>*. A la izquierda aparece representada la evolución temporal de los discos NO RX y a la derecha, la evolución temporal de los discos RX. Para cuantificarlos se ha realizado la medida del % del área del disco ocupada por clones *ras<sup>V12</sup>* y se ha dividido en distintas subpoblaciones, representadas en distintos colores (ver leyenda del gráfico) en función de que el % del área ocupada sea mayor o menor de ciertos valores. Se ha considerado el 100% el total de discos recolectados en cada caso y en cada subgrupo está representada numéricamente la N.



al área total de cada disco. Existe cierta variabilidad en los resultados obtenidos. Así que, para poder entender el fenómeno que estábamos observando hemos subdividido cada población de discos en cinco categorías distintas en función del % del área total del disco ocupada por clones: <15%; 15-30%; 30-45%; 45-55% y >55% y las hemos representado gráficamente usando diferente color para cada una de ellas. Tomamos como 100% el número total de discos obtenidos en cada tiempo registrado (72, 96 y 120h AHS). Construimos dos gráficos a partir de los datos. En el primero, se representa la evolución temporal de las poblaciones de discos control sin irradiar (NO RX), y en el segundo, la evolución temporal de las poblaciones de discos tras la irradiación. La comparación de ambos gráficos sugiere que la irradiación acelera el crecimiento de los clones *ras<sup>V12</sup>* y a su vez incrementa el número de discos con clones muy grandes a tiempos tardíos tras la irradiación. No obstante, consideramos que mediante esta aproximación estamos subestimando el área del tejido *ras<sup>V12</sup>* real, dado que el análisis se ha realizado a partir de imágenes bidimensionales y puede apreciarse que el tejido forma numerosos pliegues, por lo que probablemente las diferencias de tamaño sean notablemente mayores.

Las activación de la vía Ras (*ras<sup>V12</sup>*) confiere a las células protección frente a la apoptosis (Bergmann et al. 1998; Kurada and White 1998). Nuestros resultados corroboran esta afirmación: el tejido *ras<sup>V12</sup>* es refractario a la apoptosis inducida por una dosis elevada de

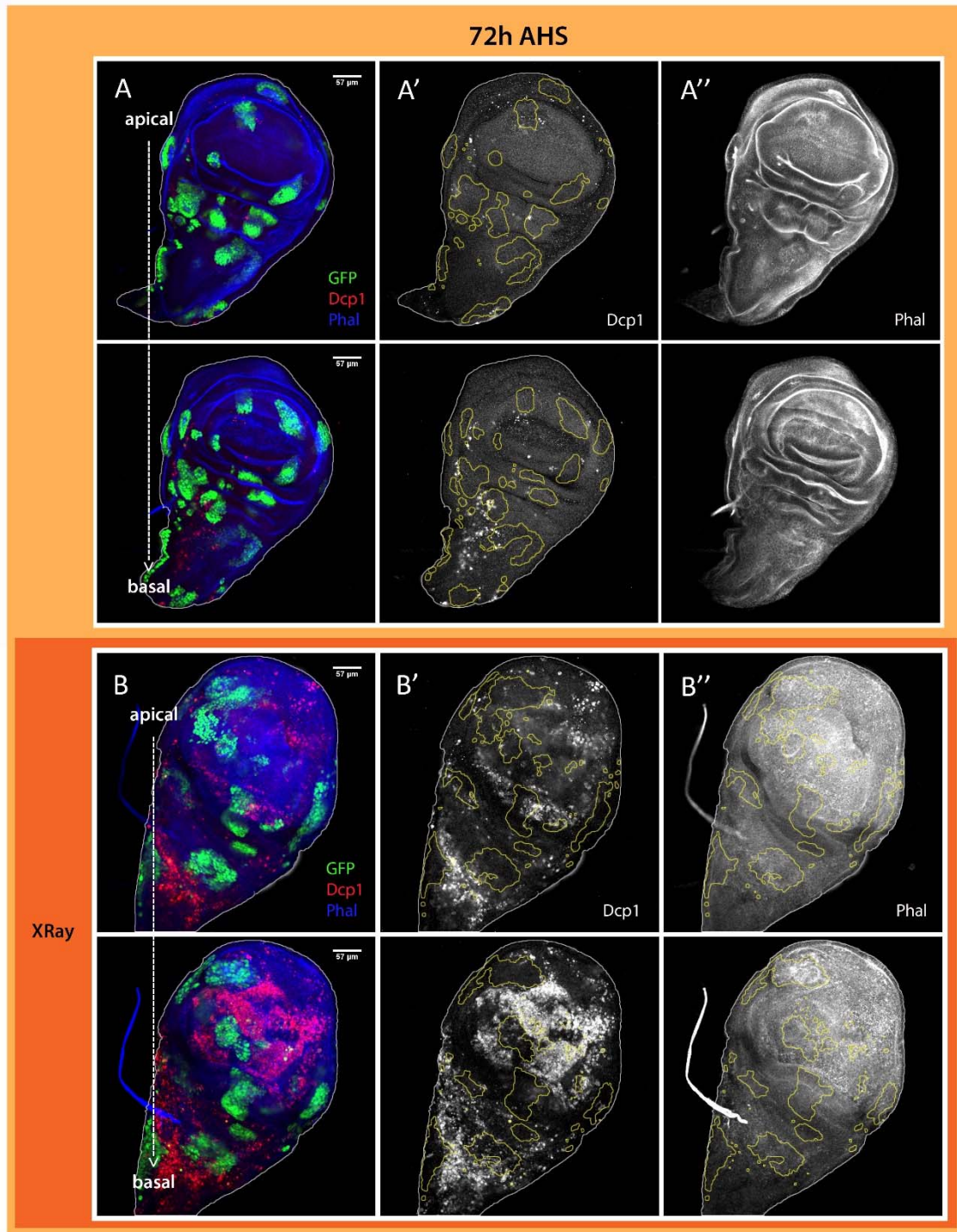
irradiación (3000R). Podemos ver en discos *sal<sup>EPV</sup>> GFP ras<sup>V12</sup>* como 24h después de la irradiación (24h ARX) hay una gran cantidad de células apoptóticas en todo el disco imaginal de ala excepto en el dominio *sal<sup>EPV</sup>* (**Figura R12. C**) y a 48h ARX, sigue habiendo muchas células marcadas con el anticuerpo contra la caspasa efectora Dcp1 activada que están siendo extruidas basalmente del epitelio imaginal. Estos detritos celulares que están siendo extruidos no proceden de células *ras<sup>V12</sup>* (**Figura R9. B**). Interesantemente, a tiempos tardíos tras la irradiación (a partir de 96h ARX), en un disco silvestre dejan de verse células apoptóticas (**Figura R9. E**), mientras que en discos con clones *ras<sup>V12</sup>* se observa apoptosis en las células silvestres, asociada al borde de los clones (**Figura R9. D**). Parece que la irradiación aumenta la persistencia de las células apoptóticas en los tejidos en los que conviven células *ras<sup>V12</sup>* y células silvestres. Es esperable que existan en el disco un gran número de señales mitogénicas procedentes de las células apoptóticas (Perez-Garijo et al. 2004; Ryoo et al. 2004). Al analizar el marcador de proliferación PH3 observamos un incremento proliferativo generalizado en el disco imaginal de ala 72h ARX, tanto en las células de los clones *ras<sup>V12</sup>* como en las células silvestres (**Figura R10**). Al igual que en un disco silvestre, las células que no están protegidas frente a la apoptosis desaparecen del tejido 48h tras la irradiación. Las células *ras<sup>V12</sup>* no mueren, por tanto, potencialmente con la misma tasa de crecimiento, pueden acabar abarcando mayor área del tejido imaginal. Sin embargo, esto no explica la persistencia de células apoptóticas en

el tejido mucho tiempo después de la irradiación.

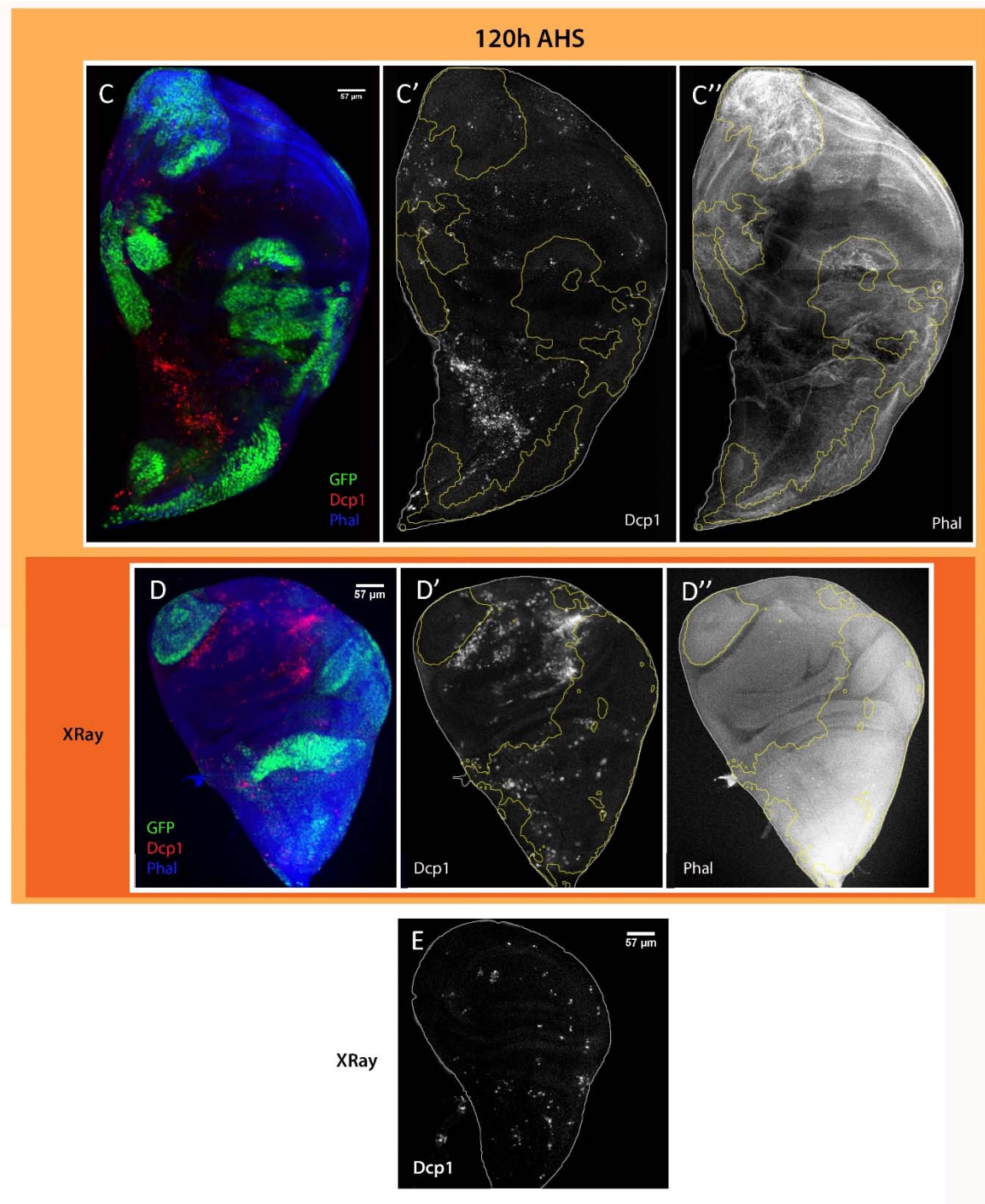
Para comprobar, aunque de manera indirecta, la activación de la ruta JNK, utilizamos el anticuerpo que reconoce Metaloproteasa-1 (MMP1), una diana de la vía. Esta proteína es una enzima proteolítica con capacidad de remodelar la matriz extracelular cuando es secretada y activada. En los clones control sin irradiar, las células del borde de los clones *ras<sup>V12</sup>* incrementan de manera autónoma los niveles de MMP1, sugiriendo una activación de la vía JNK en estas células (**Figura R11. A y B**). A tiempos tardíos tras la irradiación (72h ARX), se observa un incremento en los niveles de MMP1 en algunos focos dentro de los clones, casi siempre asociado a pliegues o al borde de los mismos. Los detritos apoptóticos presentes todavía en el disco (ver la imagen basal de la figura) también tienen marcaje positivo para MMP1 (**Figura R11. C y D**). Este resultado confirma que en respuesta a irradiación la apoptosis está mediada por la vía JNK e indica que también a tiempos tardíos tras la irradiación (72h ARX) también hay activación de la vía JNK dentro de las células *ras<sup>V12</sup>*. Resulta interesante que tiempo después del evento de irradiación siga habiendo persistencia de la actividad JNK dentro de las células de los clones *ras*, indicando que debe existir algún mecanismo de mantenimiento de la actividad JNK dentro de

estas células. Este resultado indica que la actividad de la vía JNK dentro de estos clones podría ser responsable de los sobrecrecimientos observados a partir de las 96h ARX. Además, existen numerosos ejemplos en la literatura en los que la activación de la ruta JNK induce crecimiento tumoral (Igaki et al. 2006; Milan et al. 2014; Vidal 2010; Wu et al. 2010).

Como hemos visto, la activación de la vía Ras induce tan solo un incremento de tamaño de los clones *ras<sup>V12</sup>*. Sin embargo, un único evento de irradiación en una dosis elevada (3000R) es suficiente para inducir el crecimiento tumoral de los mismos. Por efecto de la irradiación se induce la muerte por apoptosis de un altísimo número de células silvestres en estos discos, ya que las células *ras<sup>V12</sup>* están protegidas frente a la apoptosis, y a tiempos tardíos tras la irradiación (96h ARX), seguimos observando persistencia de células apoptóticas en el tejido silvestre. Estas células entran en apoptosis a través de la activación de la vía JNK, ruta que también está activada en algunas células dentro de los clones que sobrecrecen 72h ARX. La adquisición de esta actividad JNK por parte de los clones *ras<sup>V12</sup>* puede constituir el factor de transformación tumoral que necesitan las células *ras<sup>V12</sup>* para malignizarse en los tejidos imaginales de *Drosophila*.

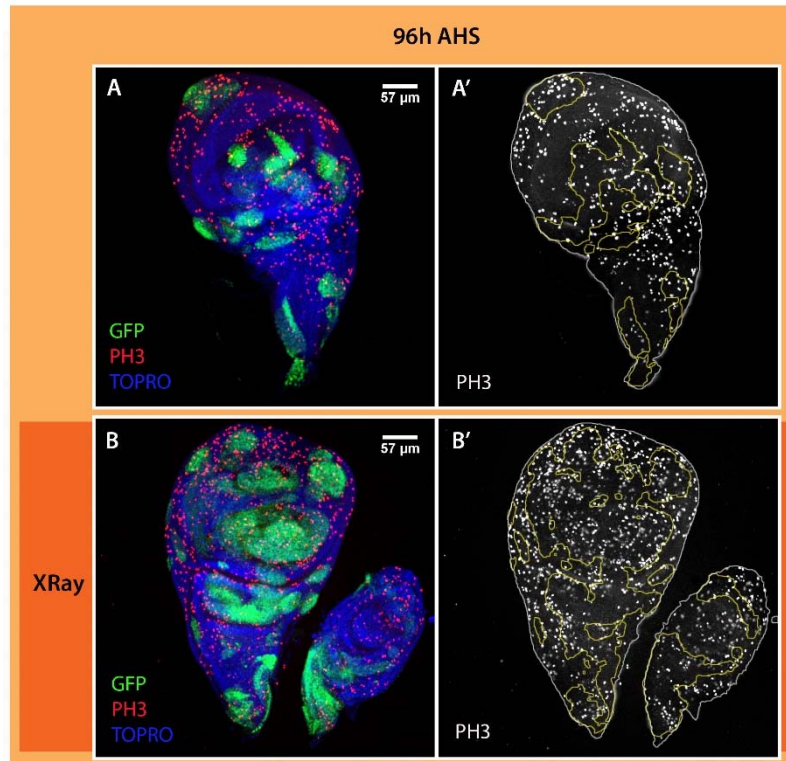


**Figura R9.** Las células de los clones *ras<sup>V12</sup>* están protegidas frente a la apoptosis inducida por una elevada dosis de irradiación con rayos X (3000R) y la presencia de clones *ras<sup>V12</sup>* aumenta la persistencia de la apoptosis a tiempos tardíos tras la irradiación. Discos con clones *ras<sup>V12</sup>* marcados en verde (GFP), teñidos para Dcp1 (apoptosis) en rojo y con Phal en azul (contorno celular). El desarrollo del experimento sigue el esquema representado en la figura R8.A. El genotipo de las larvas en todos los casos es: *yw*, *hs-Flp*, *tub-Gal4*, *UAS-GFP*; *arm-LacZ*, *FRT40A* / *tub-Gal80*, *FRT40A*; *UAS-ras<sup>V12</sup>* / +. **(A)** Disco NO RX fijado 72h AHS. **(B)** Disco RX fijado 72h AHS (48h ARX). Nótese la gran cantidad de células apoptóticas marcadas en rojo por Dcp1 aun siendo 48h después del evento de irradiación. (Continúa en la página siguiente)



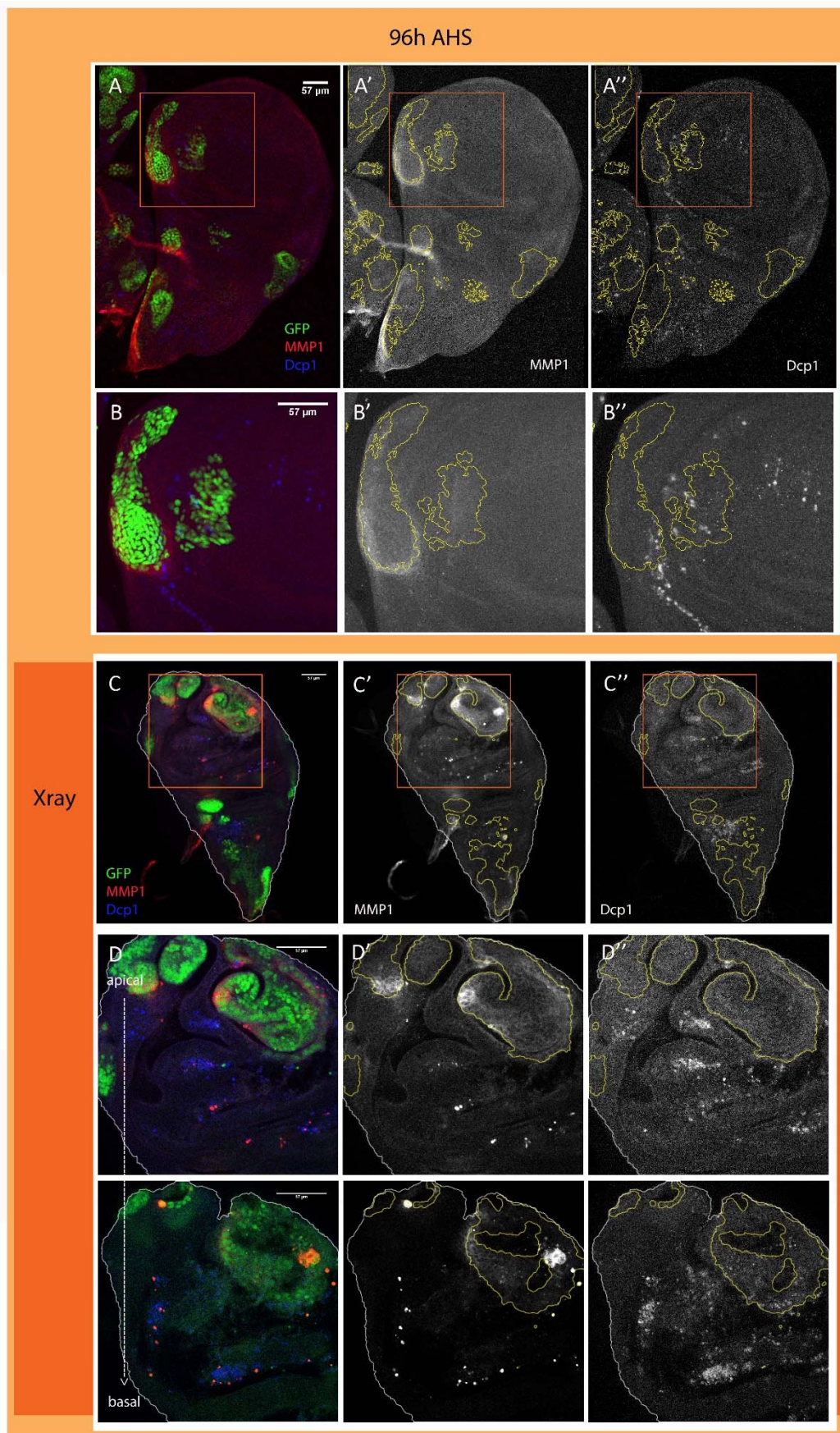
(B') Canal rojo de la imagen representado en escala de grises. El contorno de los clones está marcado en amarillo. Las células apoptóticas proceden de células silvestres del disco. Las células *ras<sup>V12</sup>* están protegidas frente a la apoptosis inducida por irradiación. (C) Disco NO RX fijado 120h AHS (D) Disco RX fijado 120h AHS (96h ARX). Se puede apreciar que hay persistencia de la apoptosis no-autónoma asociada a los bordes de los clones *ras<sup>V12</sup>* de los discos que han sido sometidos a irradiación. (E) Disco silvestre irradiado fijado 96h ARX. Apréciase que la apoptosis inducida por irradiación prácticamente ha desaparecido del disco en un disco sin clones *ras<sup>V12</sup>*, mientras que en un disco con clones, la apoptosis persiste durante mucho tiempo después de la irradiación.





**Figura R10.** En discos con clones *ras<sup>V12</sup>* la proliferación se incrementa de manera homogénea en todo el disco por efecto de la irradiación. Discos con clones *ras<sup>V12</sup>* marcados en verde (GFP), teñidos para PH3 en rojo y con TOPRO en azul (núcleos). El desarrollo del experimento sigue el esquema representado en la figura R8.A. El genotipo de las larvas en todos los casos es: *yw*, *hs-Flp*, *tub-Gal4*, *UAS-GFP*; *arm-LacZ*, *FRT40A* / *tub-Gal80*, *FRT40A*; *UAS-ras<sup>V12</sup>* / +. **(A)** Disco NO RX fijado 96h AHS. **(B)** Disco RX fijado 96h AHS (72h ARX). Los niveles de proliferación se incrementan de manera homogénea en todas las células del disco, tanto silvestres como *ras<sup>V12</sup>*, por efecto de la irradiación. (Arriba)

**Figura R11.** En discos con clones *ras<sup>V12</sup>* irradiados, el marcaje con MMP1 indica de manera indirecta que hay una activación de la vía JNK en las células apoptóticas y en algunas células dentro de los clones *ras<sup>V12</sup>*. Discos con clones *ras<sup>V12</sup>* marcados en verde (GFP), teñidos para Metaloproteasa1 (MMP1), un gen diana de la actividad de la vía JNK, en rojo y para Dcp1 en azul. El desarrollo del experimento sigue el esquema representado en la figura R8.A. El genotipo de las larvas en todos los casos es: *yw*, *hs-Flp*, *tub-Gal4*, *UAS-GFP*; *arm-LacZ*, *FRT40A* / *tub-Gal80*, *FRT40A*; *UAS-ras<sup>V12</sup>* / +. **(A, B)** Disco NO RX fijado 96h AHS. **(B)** Detalle de la región recuadrada en la imagen **(A)**. De manera autónoma, las células del borde de los clones *ras<sup>V12</sup>* incrementan su marcaje extracelular para MMP1, sugiriendo una activación de la vía JNK también en estas células del borde de los clones *ras<sup>V12</sup>* **(C, D)** Disco RX fijado 96h AHS (72h ARX). **(D)** Aumento de la región recuadrada en la imagen **(C)**. A tiempos tardíos tras la irradiación, se observa un incremento en los niveles de MMP1 en algunos focos dentro de los clones, casi siempre asociado a pliegues o al borde de los clones. También puede observarse marcaje para MMP1 en alguno de los detritos apoptóticos presentes entre las células silvestres (región basal de la imagen **(D)**). (Página siguiente)



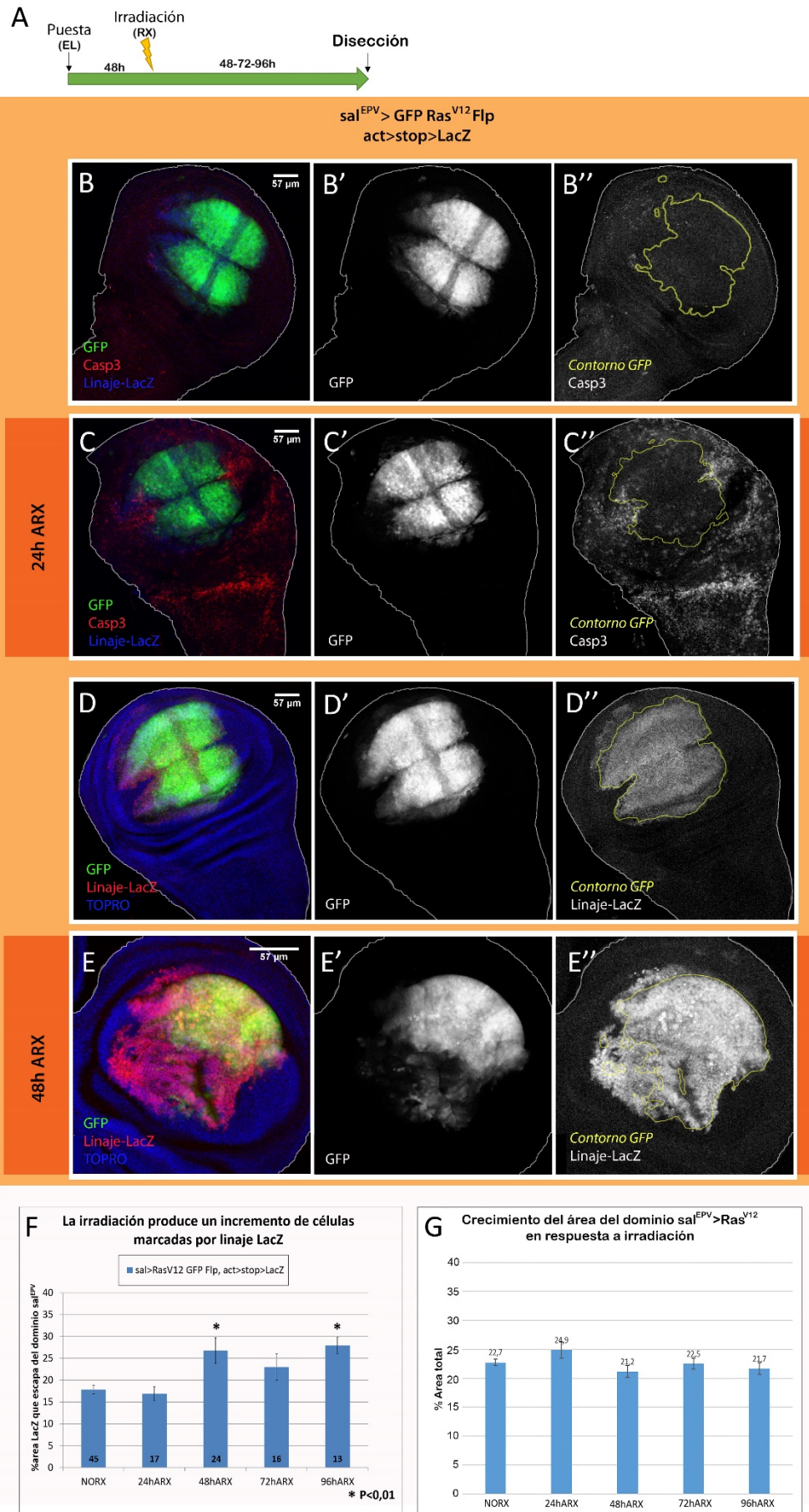
## - Respuesta de los dominios $sal^{EPV} > ras^{V12}$ a una elevada dosis de irradiación

Para estudiar la evolución de los dominios  $sal^{EPV} > ras^{V12}$  GFP en respuesta a una dosis elevada de irradiación (3000R), utilizamos el marcaje de linaje valiéndonos de la construcción UAS-Flp y el *cassette* de linaje  $act5C > stop > lacZ$  (Ver Material y Métodos. Figura M5). Hacemos puestas homólogas en paralelo para obtener larvas  $sal^{EPV} > GFP$   $Ras^{V12}$  Flp;  $act5C > stop > LacZ$ . Dejamos crecer la puesta durante 48h, ya que sabemos que aproximadamente 48h AEL el gen *sal* comienza a expresarse y, por lo tanto, comienza la expresión del driver  $sal^{EPV}$ , de modo que nos aseguramos que las larvas más jóvenes ya han comenzado a expresar  $ras^{V12}$  en el tejido larvario. Sometemos a una de las puestas a una dosis alta de irradiación (3000R) con rayos-X (RX). Fijamos las larvas experimentales a

distintos tiempos tras la irradiación (48-72-96h ARX) al mismo tiempo que las larvas control sin irradiar, una vez que han alcanzado el tercer estadio tardío del desarrollo larvario y las teñimos con un anticuerpo que reconoce el gen de la  $\beta$ -Galactosidasa (LacZ). La irradiación no produce un incremento en el tamaño del área ocupada por el dominio *sal* marcado por GFP (en porcentajes, pasa de un 22,5% (n=45) en una situación sin irradiar, a un 21,7% (n=13) a las 96hARX) (**Figura R12. G**), así que la medida de la evolución del linaje celular marcado con  $\beta$ -Galactosidasa nos permite estudiar cómo se comportan las células del dominio  $sal^{EPV}$  en respuesta a irradiación (**Figura R12. A**). A las 24h ARX (16,9%, n=17) no hay variación en el valor medio del % de área marcada por linaje que “escapa” del dominio  $sal^{EPV}$  respecto a la situación sin irradiar (17,8%, n= 45) no siendo significativa la diferencia entre ambas medidas. Sin embargo, las diferencias comienzan a ser

**Figura R12. La irradiación incrementa el linaje marcado para las células  $sal^{EPV} > ras^{V12}$  que escapa del dominio *sal*.** (A) Esquema del desarrollo del experimento en el que hacemos puestas homólogas en paralelo para larvas  $sal^{EPV} > GFP$ ,  $Ras^{V12}$ , Flp;  $act5C > stop > LacZ$ . Aproximadamente 48h AEL el gen *sal* comienza a expresarse y, por lo tanto, comienza la expresión del driver  $sal^{EPV}$ . Sometemos a una de las puestas a una dosis alta de irradiación (3000R) con rayos-X (RX). Fijamos las larvas experimentales a distintos tiempos tras la irradiación (48-72-96h ARX) al mismo tiempo que las larvas control sin irradiar, una vez que han alcanzado el tercer estadio tardío del desarrollo larvario. (B-E) Evolución temporal del linaje-LacZ en respuesta a una dosis elevada de irradiación. (B, C) Tinción para Casp3 en rojo, que detecta la caspasa efectora Drice, y para  $\beta$ gal en azul (linaje-LacZ). (B) Disco control NO RX (C) Disco RX fijado 24h ARX. Puede apreciarse como a tiempos tempranos tras la irradiación las células silvestre del disco mueren masivamente por apoptosis excepto en la región  $sal^{EPV} > ras^{V12}$ , indicando que estas células que activan constitutivamente la vía Ras están protegidas de la apoptosis inducida por altas dosis de irradiación. (D, E) Tinción para  $\beta$ gal en rojo (Linaje-LacZ) procedente del dominio  $sal^{EPV} > ras^{V12}$ , y marcaje nuclear TOPRO en azul. (D) Disco control NO RX (E) Disco RX fijado 48h ARX. A las 48h ARX hay un incremento en las células con linaje-LacZ marcado que escapa del dominio  $sal^{EPV}$  y que pierde la expresión de GFP. (F) Representación gráfica de la evolución temporal en el linaje-LacZ marcado que escapa del dominio  $sal^{EPV}$ . Puede observarse que a partir de las 48h ARX hay un incremento significativo del % área marcada por linaje que escapa del dominio  $sal^{EPV}$ . La contribución del linaje-LacZ hacia el tejido circundante al dominio *sal* pasa de ser un 17% del área total en los casos NO RX a un 27% a las 96h ARX ( $p < 0,01$ ). Esta contribución podría deberse a la protección frente a la apoptosis que confiere a estas células la expresión de  $ras^{V12}$ .







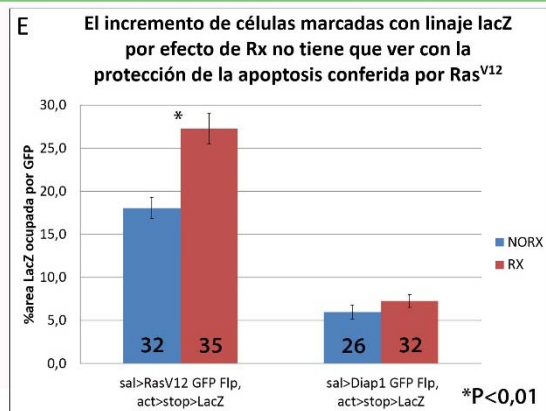
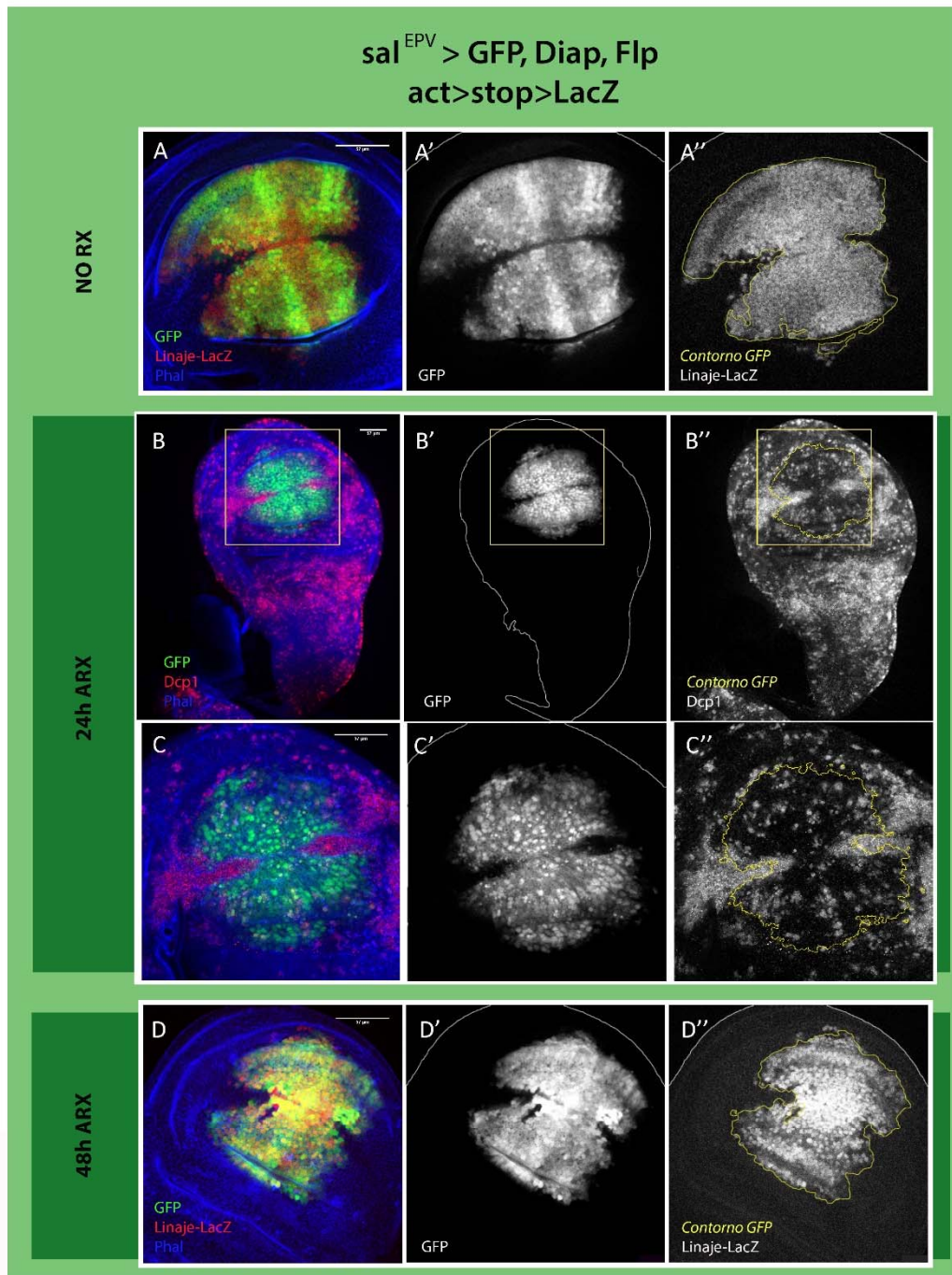
significativas a partir de las 48h después de la irradiación, en las que la contribución del linaje pasa de ser de un 17% del área total a un 27% ( $p < 0,01$ ), siendo a las 48h ARX de un 26,9% ( $n=24$ ) y a las 96h ARX de 27,9% ( $n=13$ ) (Figura R12).

En este contexto no obtenemos sobrecrecimientos como los observados con los clones *ras<sup>V12</sup>*, pero sin embargo, observamos una mayor contribución del linaje celular de *sal* hacia el resto del disco. Para comprobar si la apoptosis puede explicar tal expansión del linaje marcado con  $\beta$ -Gal, hacemos un experimento análogo sobreexpresando un inhibidor de la apoptosis: Diap1.

## - Respuesta de los dominios *sal<sup>EPV</sup>*>Diap1 a una elevada dosis de irradiación

Para comprobar la capacidad repobladora de células protegidas frente a la apoptosis, realizamos un experimento que sigue un esquema similar al anterior pero con larvas que expresan el inhibidor de caspasas Diap1. Utilizamos larvas *sal<sup>EPV</sup> > GFP Diap1 F1p*; *act>stop>LacZ* cuyo genotipo es: *w*; *sal<sup>EPV</sup>*; *UAS-GFP/+*; *UAS-Diap1/ act5C>stop>lacZ*, *UAS-F1p*. Como puede verse (Figura R13) 24h ARX, la expresión de esta proteína anti-apoptótica en el dominio *sal<sup>EPV</sup>* confiere cierta represión de la apoptosis, pero esta no es total. Se observa una acumulación de células apoptóticas en el borde D/V del disco, flanqueando a la región marcada por GFP del dominio *sal<sup>EPV</sup>*. Sin embargo, no existe una

**Figura R13. La inhibición de la apoptosis no es condición suficiente para explicar la contribución del linaje-LacZ hacia el tejido circundante que experimentan las células *sal<sup>EPV</sup>*>*ras<sup>V12</sup>* en respuesta a irradiación. (A-D)** Discos que en dominios *sal<sup>EPV</sup>*, marcados en verde (GFP), expresan la proteína inhibidora de caspasas Diap1 y la recombinasa F1p para marcar el linaje celular con el *cassette act5C>stop>LacZ*. El genotipo de estas larvas es *sal<sup>EPV</sup> > GFP, Diap1, F1p; act>stop>LacZ: w*; *sal<sup>EPV</sup> UAS-GFP/+*; *UAS-Diap1/ act5C>stop>lacZ, UAS-F1p*. El desarrollo de este experimento sigue el mismo esquema que el mostrado en el esquema representado en la figura R12.A. **(B, C)** Disco RX fijado 24h ARX. Tinción para Dcp1 en rojo (apoptosis) y Phal en azul (contorno celular). **(C)** Ampliación del recuadro marcado en la imagen B. Obsérvese que las células del dominio *sal<sup>EPV</sup> > Diap1* están más protegidas frente a la apoptosis inducida por la elevada dosis de radiación que las células silvestres del disco. Se observa un acúmulo de células apoptóticas en el borde D/V del disco flanqueando a la región marcada en verde del dominio *sal<sup>EPV</sup>* aunque puede apreciarse que la inhibición de la apoptosis mediante la expresión de una dosis de Diap1 no es total. **(A, D)** Tinción para  $\beta$ gal en rojo (linaje-LacZ) y Phal en azul (contorno celular). En ambos casos puede apreciarse a simple vista la coincidencia célula a célula entre las células del dominio GFP y las marcadas por linaje-LacZ. **(A)** Disco control NO RX. **(D)** Disco RX fijado 48h ARX. **(E)** Representación gráfica del % área total marcada por linaje-LacZ que escapa del dominio *sal<sup>EPV</sup>* comparando *ras<sup>V12</sup>* con Diap1. Las barras de la izquierda representan larvas que expresan *ras<sup>V12</sup>* (*sal<sup>EPV</sup> > GFP, Ras<sup>V12</sup>, F1p; act>stop>LacZ*) y las de la derecha, larvas que expresan Diap1 (*sal<sup>EPV</sup> > GFP, Diap1, F1p; act>stop>LacZ*). En un contexto NO RX (representado en las barras azules) y en un contexto RX (48h ARX) (representado en las barras rojas). Obsérvese la ausencia de variación en la contribución del linaje por efecto de la irradiación en el caso de las células Diap1 frente al incremento de células marcadas en el caso de células *ras<sup>V12</sup>*.

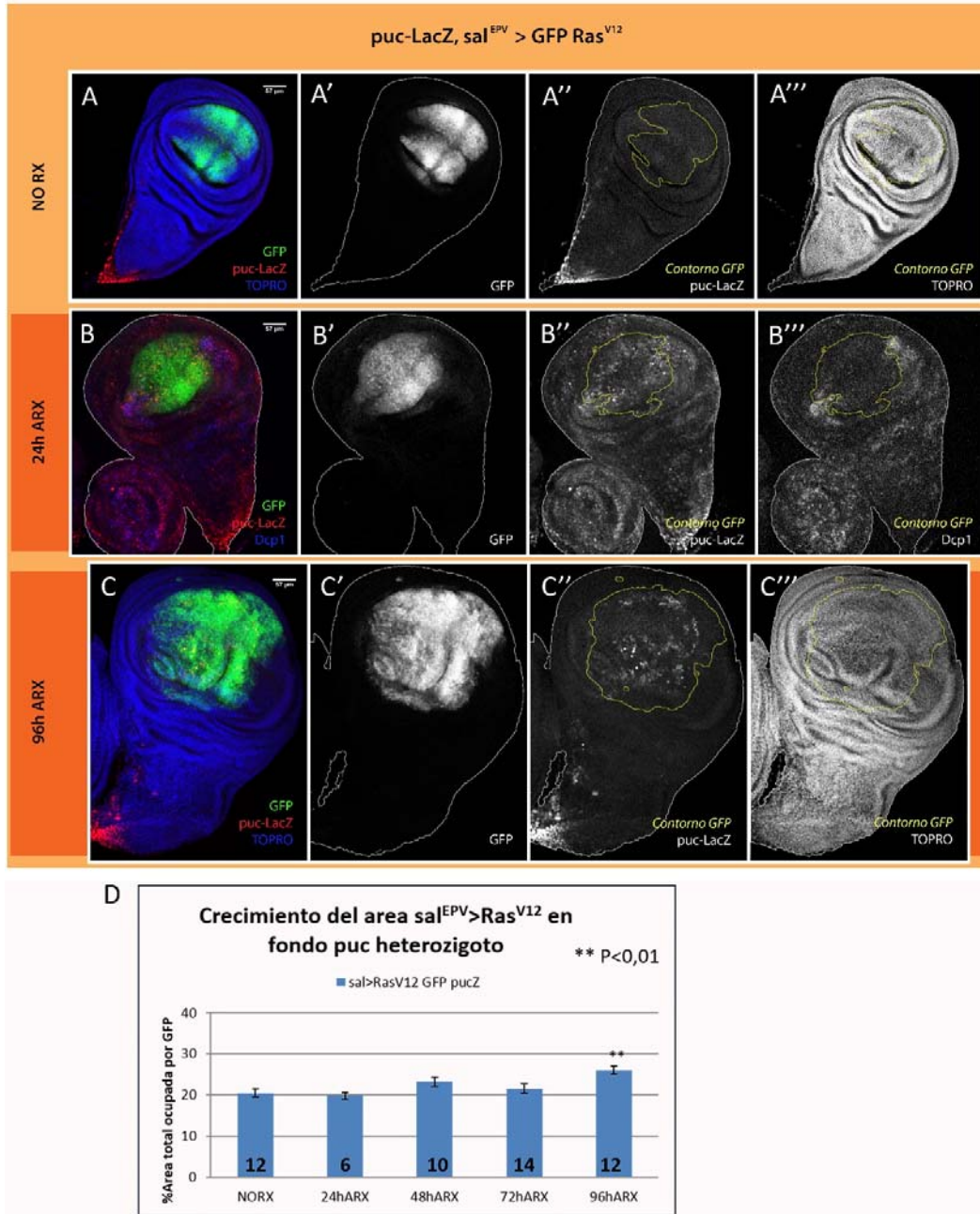


expansión del linaje-LacZ como el que observábamos con la sobre-expresión de *ras<sup>V12</sup>* en larvas *sal<sup>EPV</sup> > GFP *ras<sup>V12</sup>* F1p; *ac>stop>LacZ*, siendo para los controles no irradiados del 6% (n=26) y para los discos 48h ARX, del 7% (n=32), no siendo significativa la diferencia. Esto nos podría estar indicando que la contribución a la recuperación de las células perdidas tras la irradiación no sólo se debe a la inhibición de la apoptosis que confiere la activación de la vía Ras.*

### 3.- Papel que juega JNK en la inducción de sobrecrecimientos:

La tinción para MMP1 en discos con clones *ras<sup>V12</sup>* irradiados sugería que la activación de la vía JNK podría jugar un papel importante estimulando el crecimiento de estas células. Para visualizar directamente la activación de la ruta molecular JNK, en este experimento utilizamos una construcción *puc-LacZ*, ya que el gen *puc* es un gen diana de la activación de la vía JNK y también un regulador negativo de la misma. Esta construcción genética posee el promotor del gen *puc* dirigiendo la expresión de la proteína  $\beta$ -galactosidasa (LacZ) que será reconocido por el anticuerpo anti- $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal). En un disco de ala silvestre, *puc-LacZ* puede visualizarse en las células del tallo, justamente la región del disco que durante la metamorfosis dirigirá la fusión de los dos hemitóraces procedentes de los dos discos de ala que posee la larva. Generamos discos de ala *puc-LacZ*; *sal<sup>EPV</sup> > ras<sup>V12</sup> GFP* (genotipo: *w*; *sal<sup>EPV</sup>*, *UAS-GFP* / *UAS-ras<sup>V12</sup>*; *puc-LacZ* / +) que irradiamos a las 48h AEL con una dosis 3000R de RX y fijamos a distintos

tiempos tras la irradiación. Observamos la evolución temporal de la actividad *puc-LacZ* en respuesta a irradiación (**Figura R14**). En los discos control NO RX puede observarse la expresión silvestre de *puc* en las células del tallo. A las 24h ARX observamos que existe una activación generalizada de la vía JNK en las células del disco, tanto fuera como dentro del dominio *sal<sup>EPV</sup> > ras<sup>V12</sup> GFP*. Significativamente, 96h ARX persisten células positivas para *puc-LacZ* dentro del dominio *sal<sup>EPV</sup> > ras<sup>V12</sup> GFP* cuando esta actividad ha desaparecido en el resto del disco, sugiriendo que alguna característica de la activación constitutiva de la vía Ras permite dentro del dominio *sal* una activación persistente de la vía JNK. Además puede apreciarse un incremento significativo del tamaño del dominio *sal<sup>EPV</sup>*. La presencia de pliegues en este tejido sugiere un crecimiento del dominio incluso mayor del medido. Para cuantificar este aumento de tamaño del *sal<sup>EPV</sup> > ras<sup>V12</sup> GFP*, realizamos mediciones de las áreas relativas ocupadas por GFP (**Figura R14.D**) y vimos que a las 96h ARX existe un disco sin irradiar, a un 25% (n=12) ( $p < 0,01$ ). Este valor es muy probablemente menor que el real debido a la presencia de plegamientos del tejido que no se consideran en la medición. Lo que marca la diferencia con el experimento anterior, donde no obteníamos variaciones en el tamaño del dominio en respuesta a irradiación, es que en este experimento la construcción *puc-LacZ* hace a las células que la portan mutantes heterocigóticas para el gen *puc*, y permite que en las células en las que la vía se activa haya menor represión de la actividad de la misma.



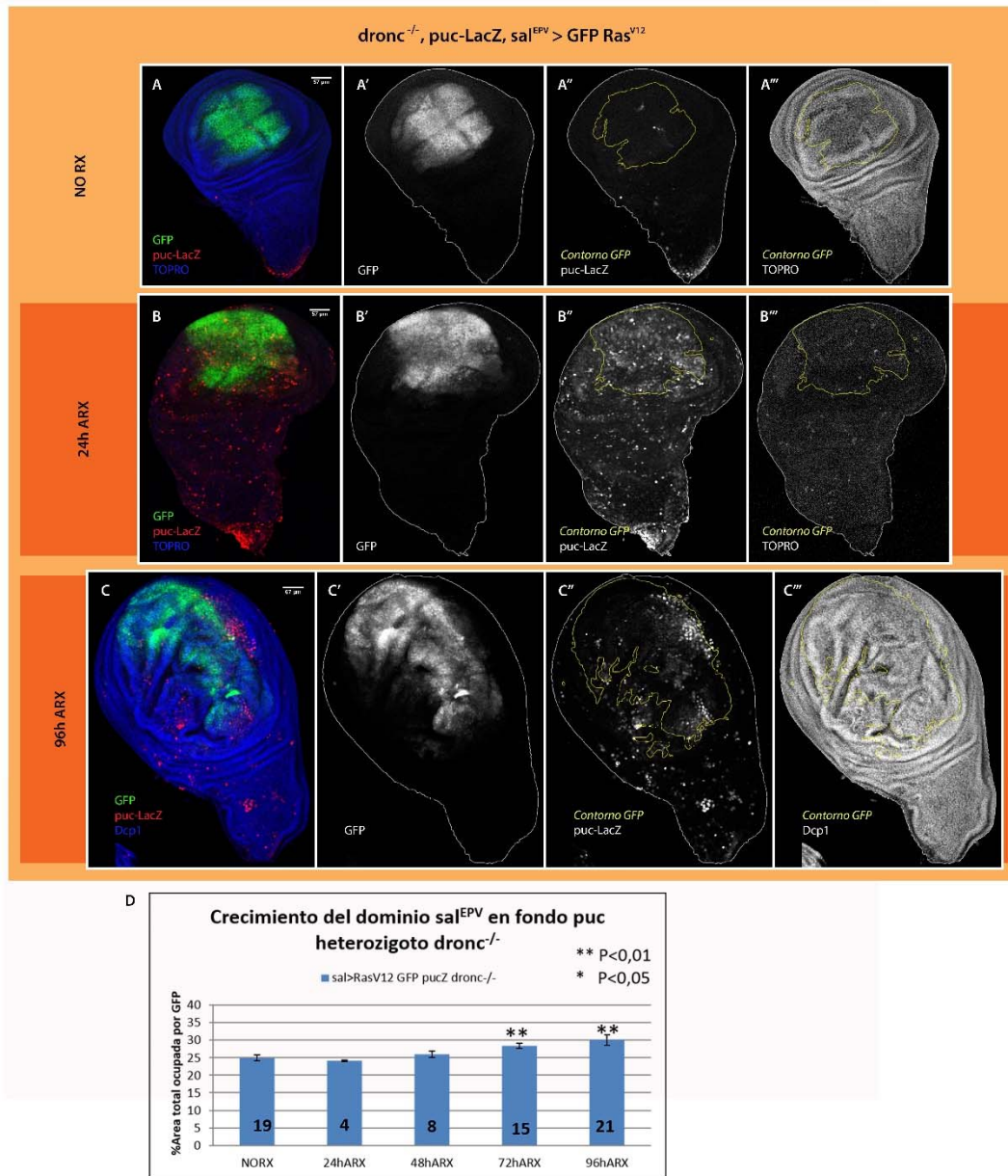
**Figura R14. Persistencia de la actividad de la vía JNK y crecimiento del dominio en un contexto sal<sup>EPV</sup>> ras<sup>V12</sup> en respuesta a irradiación.** Evolución temporal de la actividad JNK en los discos *puc-LacZ*; sal<sup>EPV</sup> > GFP *ras*<sup>V12</sup> en respuesta a irradiación. El genotipo de estos discos es *w*; sal<sup>EPV</sup>, UAS-GFP / UAS-*ras*<sup>V12</sup>; *puc-LacZ* / +. Los dominios sal<sup>EPV</sup> están marcados en verde (GFP). Visualizamos la activación de JNK mediante la construcción *puc-LacZ* utilizando un anticuerpo contra βgal. (A y C) Tinciones con βgal en rojo (puc) y TOPRO en azul (marcage nuclear). Puede observarse la activación de la vía JNK en los tallos de los (A) discos control NO RX. (B) Disco RX fijado 24h ARX teñido para βgal en rojo y para Dcp1 (apoptosis) en azul. Apréciase que a tiempos tempranos tras la irradiación existe una activación generalizada de la vía JNK en las células del disco (B''). Mientras que tan sólo las células del dominio sal<sup>EPV</sup> > ras<sup>V12</sup> están protegidas frente a la apoptosis (B'''). (C) Disco RX fijado 96h ARX. Sorprendentemente, encontramos que los dominios sal<sup>EPV</sup> > GFP *ras*<sup>V12</sup> aumentan de tamaño (C'), el epitelio en esa región aparece además ligeramente plegado (C'') y que tras 96h ARX persisten células con actividad JNK dentro del dominio sal<sup>EPV</sup> > GFP *ras*<sup>V12</sup> (C'''). (D) Representación gráfica de la evolución temporal del área del dominio sal<sup>EPV</sup> > GFP *ras*<sup>V12</sup>.



Para determinar el papel que tienen las células apoptóticas en la promoción de esta actividad JNK, realizamos el mismo experimento en un fondo genético refractario a la apoptosis, utilizando dos alelos hipomorfos del gen *dronc* en heterozigosis (*dronc<sup>24</sup>/dronc<sup>29</sup>*, a los que llamaré *dronc<sup>-/-</sup>*), que codifica para una de las caspasas iniciadoras en *Drosophila melanogaster* (D. Xu et al. 2005) (**Figura R15**). Generamos larvas *puc-LacZ; dronc<sup>-/-</sup>; sal<sup>EPV</sup> > ras<sup>V12</sup> GFP* (cuyo genotipo es: *w; sal<sup>EPV</sup>, UAS-GFP / +; puc-LacZ, dronc<sup>24</sup> / UAS-ras<sup>V12</sup>, dronc<sup>29</sup>*). A las 24h ARX las células del disco presentan una respuesta de activación de la vía JNK similar a la que se observa en un fondo genético sensible a la apoptosis. Para nuestra sorpresa, 96h ARX existe persistencia de actividad JNK en células no sólo del dominio *sal<sup>EPV</sup> > ras<sup>V12</sup> GFP*, sino de todo el disco. Además, estos discos están enormemente sobre-crecidos, mostrando una forma de disco reconocible pero con un “pouch” notablemente aumentado en una imagen plana y mostrando numerosos pliegues (lo cual incrementa todavía más el área del mismo). Sin embargo, como se puede apreciar en las imágenes, la región presuntiva del “notum” apenas varía de tamaño y forma. Relacionamos inmediatamente la persistencia de la actividad de la vía JNK con el fenotipo de sobre-crecimiento tumoral inducido sobre las células *ras<sup>V12</sup>*, pues, como ya he apuntado, existen numerosos ejemplos en la literatura en los que la actividad JNK está implicada en tumorigénesis.

Tomando conjuntamente el resultado obtenido de irradiar larvas *puc-LacZ;*

*sal<sup>EPV</sup>>ras<sup>V12</sup> GFP* en un fondo genético silvestre y en otro refractario a la apoptosis (*dronc<sup>-/-</sup>*) podemos ver que la persistencia de la actividad JNK tan sólo se produce en células que no pueden llevar a cabo la muerte celular, en el primer caso en células *ras<sup>V12</sup>* y en el segundo en células de cualquier región del disco, sugiriendo que la inhibición de la apoptosis podría ser responsable del mantenimiento de la actividad JNK desde el momento de la irradiación. Para comprobarlo, estudiamos entonces la persistencia de la actividad JNK a lo largo del tiempo después de un tratamiento de irradiación en larvas solamente refractarias a la apoptosis (*dronc<sup>-/-</sup>*), *puc-LacZ; dronc<sup>-/-</sup>; sal<sup>EPV</sup> > GFP* (con genotipo: *w; sal<sup>EPV</sup>, UAS-GFP / +; puc-LacZ, dronc<sup>24</sup> / dronc<sup>29</sup>*). En este contexto sin *ras<sup>V12</sup>*, a las 96h ARX obtuvimos los discos imaginales de ala, que presentaban grupos de células positivas para *puc-LacZ*. Observamos que en situaciones en las que se agrupaban varias células con actividad persistente JNK, se podían ver deformidades en el tejido circundante, sobre todo en el “pouch” (obsérvese la diferencia de tamaño, apreciable a simple vista, entre el “pouch” de una situación sin irradiar y a las 96h ARX), sin embargo, estas deformidades no son nunca tan grandes como las originadas en discos *dronc<sup>-/-</sup>; sal<sup>EPV</sup> > ras<sup>V12</sup> GFP* (**figura R16**), al menos con la misma dosis de irradiación. Estas células positivas para JNK y persistentes a lo largo del tiempo, probablemente están emitiendo los morfógenos Wg y Dpp hacia las células circundantes y estimulando su proliferación de manera continuada, pues no desaparecen del tejido. Para determinar la procedencia de las células .



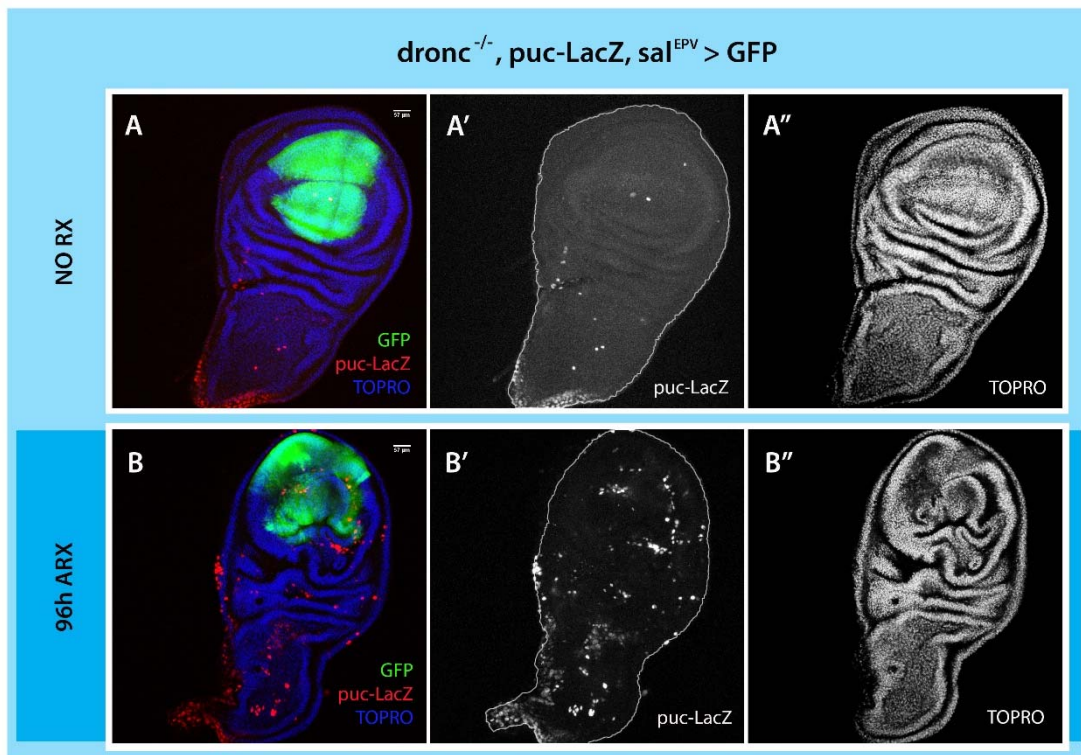
**Figura R15. Persistencia de la actividad de la vía JNK y crecimiento del disco en *sal*<sup>EPV</sup> > *ras*<sup>V12</sup> en un fondo genético defectivo para la apoptosis (*dronc*<sup>-/-</sup>) en respuesta a irradiación.** Evolución temporal de la actividad JNK en los discos *puc-LacZ*; *dronc*<sup>-/-</sup>; *sal*<sup>EPV</sup> > *GFP ras*<sup>V12</sup> por efecto de la irradiación. El genotipo de estos discos es *w*; *sal*<sup>EPV</sup>, *UAS-GFP* / +; *puc-LacZ*, *dronc*<sup>124</sup> / *UAS-ras*<sup>V12</sup>, *dronc*<sup>129</sup>. Los dominios *sal*<sup>EPV</sup> están marcados en verde (GFP). Visualizamos la activación de JNK mediante la construcción *puc-LacZ* utilizando un anticuerpo contra βgal. (A y C) Tinción con βgal en rojo (*puc*) y TOPRO en azul (marcage nuclear). Puede observarse la activación silvestre de la vía JNK en los tallos de los (A) discos control NO RX. (B) Disco fijado 24h ARX teñido para βgal en rojo y para Dcp1 en azul. Apréciase la deformidad del dominio *dronc*<sup>-/-</sup>; *sal*<sup>EPV</sup> > *GFP ras*<sup>V12</sup> ya a las 24h tras la irradiación (B'), así como la activación generalizada de la vía JNK en las células del disco (B''). Además podemos ver cómo la apoptosis se ha suprimido en todo el disco pues apenas hay células positivas para Dcp1 (B'''). (C) Disco RX fijado 96h ARX. Sorprendentemente, encontramos discos no solo con un dominio *sal*<sup>EPV</sup> > *GFP ras*<sup>V12</sup> muy sobrecrecido (C'), sino con todo el "wing pouch" de mayor tamaño. Apréciase el gran número de pliegues en el tejido (C'') y la persistencia de células con actividad JNK tras 96h ARX, no sólo dentro del dominio *sal*, sino en todo el disco imaginal (C'''). La inhibición de la apoptosis está permitiendo la persistencia de la actividad JNK mucho tiempo después del evento de irradiación. (D) Representación gráfica de la evolución temporal del % del área total ocupada por el dominio *sal*<sup>EPV</sup> > *GFP ras*<sup>V12</sup> en fondo genético *dronc*<sup>-/-</sup>.

## RESULTADOS

que sobrecrecen en el experimento *dronc*<sup>-/-</sup>; *sal*<sup>EPV</sup> > GFP *ras*<sup>V12</sup> marcamos el linaje celular del dominio *sal* mediante el uso de la construcción UAS-Flp y el *cassette* de marcaje de linaje *act5C>stop>lacZ*. El genotipo de las larvas utilizadas es: *w*; *sal*<sup>EPV</sup>, UAS-GFP/*act5C>stop>lacZ*; UAS-Flp, *dronc*<sup>124</sup>/UAS-*ras*<sup>V12</sup>, *dronc*<sup>129</sup>. Observamos un apreciable incremento del porcentaje del área ocupada por linaje-LacZ que ha perdido la expresión de GFP del dominio *sal*<sup>EPV</sup> en tiempos tardíos tras la irradiación, pasando de apenas un 2% (n=6) en los discos sin irradiar al 30% (n=9) a las 96h ARX (Figura R17). Indicando que probablemente la mayor

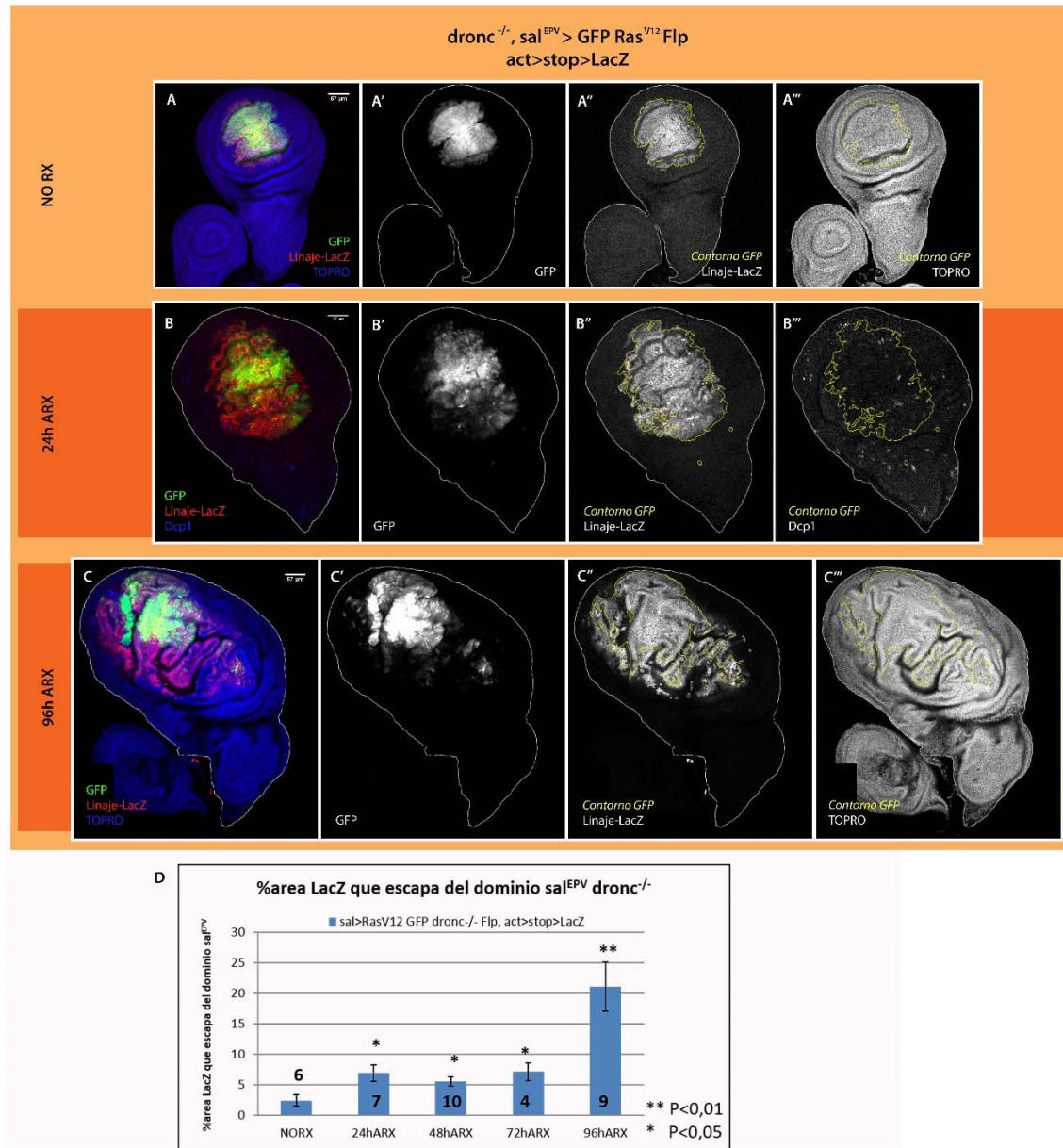
parte de las células que conforman el enorme sobre-crecimiento observado procede del tejido *ras*<sup>V12</sup>. En esta situación, los valores de diferencia de linaje LacZ y GFP son bastante bajos.

Para asegurar que la actividad JNK es responsable de estos sobre-crecimientos observados en *dronc*<sup>-/-</sup>; *sal*<sup>EPV</sup> > *ras*<sup>V12</sup> GFP, tendríamos que hacer el mismo experimento inhibiendo la actividad de la vía. Para ello sobre-expresamos el gen *puc*, que actúa como regulador negativo de la vía, mediante la construcción UAS-*puc*14C.



**Figura R16. Persistencia de la actividad JNK en discos con un fondo genético defectivo para la apoptosis (*dronc*<sup>-/-</sup>) a tiempos tardíos después de un evento de irradiación. (A y B) Discos *puc*-LacZ; *dronc*<sup>-/-</sup>; *sal*<sup>EPV</sup> > GFP; *w*; *sal*<sup>EPV</sup>, UAS-GFP *l*+; *puc*-LacZ, *dronc*<sup>124</sup> / *dronc*<sup>129</sup>. En verde está marcado el dominio *sal*, marcados en rojo con βgal (*puc*) y, por tanto, la activación de la vía JNK, y en azul con TOPRO (marcaje nuclear). (A) Disco control NO RX. (B) Disco RX fijado 96h ARX. Puede observarse la persistencia de la actividad JNK en todo el tejido *dronc*<sup>-/-</sup> a tiempos tardíos después de la irradiación (B') así como la presencia de pequeñas deformidades en el epitelio del disco imaginal de ala, se incrementa el número de pliegues (B'') comparado con la situación silvestre (A''). (Imágenes cedidas por Noelia Pinal)**





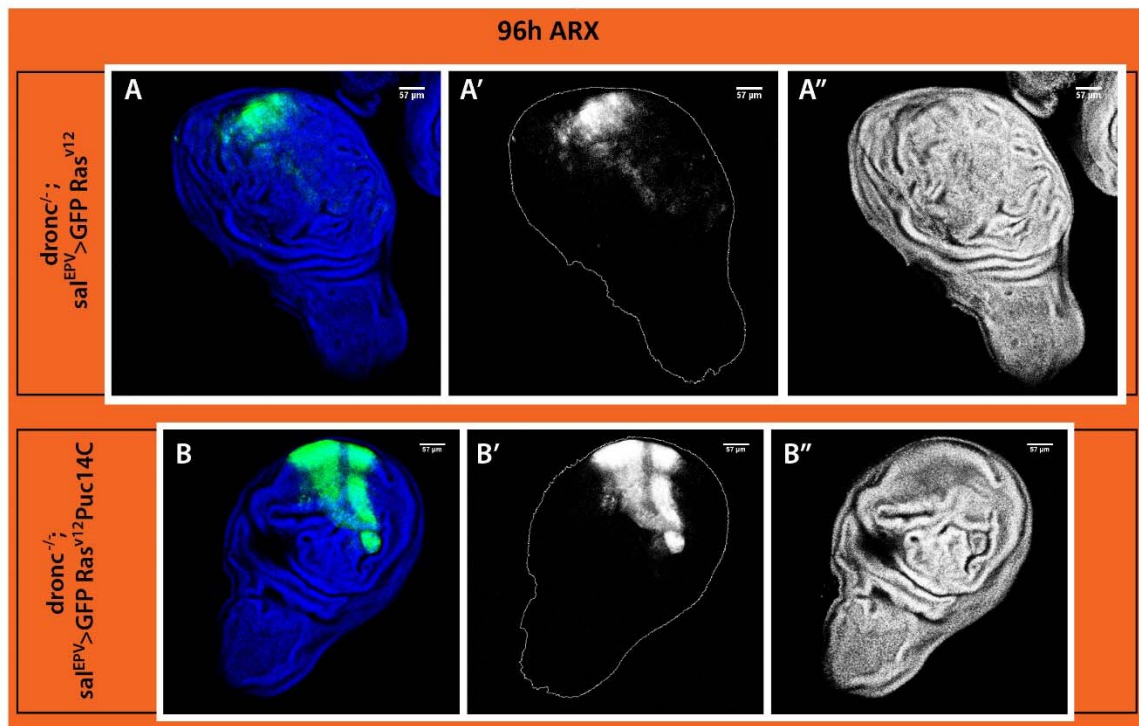
**Figura R17.** El marcaje de linaje-LacZ indica que la mayor parte del tejido que sobrecrece en respuesta a irradiación en dominios *sal<sup>EPV</sup>>ras<sup>V12</sup> GFP* en un fondo genético defectivo para la apoptosis (*dronc<sup>-/-</sup>*) procede del dominio *sal*. Evolución temporal del linaje-LacZ en los discos *dronc<sup>-/-</sup>; sal<sup>EPV</sup> > GFP ras<sup>V12</sup> Flp; act5C>stop>LacZ*: *w*; *sal<sup>EPV</sup>*, UAS-GFP/ *act5C>stop>LacZ*; UAS-Flp, *dronc<sup>124</sup>*/ UAS-*ras<sup>V12</sup>*, *dronc<sup>129</sup>*, en respuesta a irradiación. Los dominios *sal<sup>EPV</sup>* están marcados en verde (GFP). (A y C) Tinciones con βgal en rojo (linaje-LacZ) y TOPRO en azul (marcaje nuclear). (A) Disco control NORX. (B) Disco RX fijado 24h ARX. Teñido para βgal en rojo y para la Dcp1 (apoptosis) en azul. Apréciase un dominio *sal<sup>EPV</sup> > GFP ras<sup>V12</sup>* ya sobrecrecido y cierta contribución del linaje-LacZ al tejido circundante. (C) Disco RX fijado 96h ARX. Encontramos discos en los que el dominio *dronc<sup>-/-</sup>; sal<sup>EPV</sup> > GFP ras<sup>V12</sup>* está sobrecrecido y además una gran contribución del linaje-LacZ al tejido circundante (C'''). (D) Representación gráfica de la evolución temporal en el % del área del linaje-LacZ que escapa del dominio *dronc<sup>-/-</sup>; sal<sup>EPV</sup> > ras<sup>V12</sup>*. Puede observarse que la contribución del linaje-LacZ al tejido externo pasa de apenas un 2% en los discos si irradiar al 30% a las 96h ARX. Probablemente la mayor parte del tejido que sobrecrece procede del tejido *ras<sup>V12</sup>*.



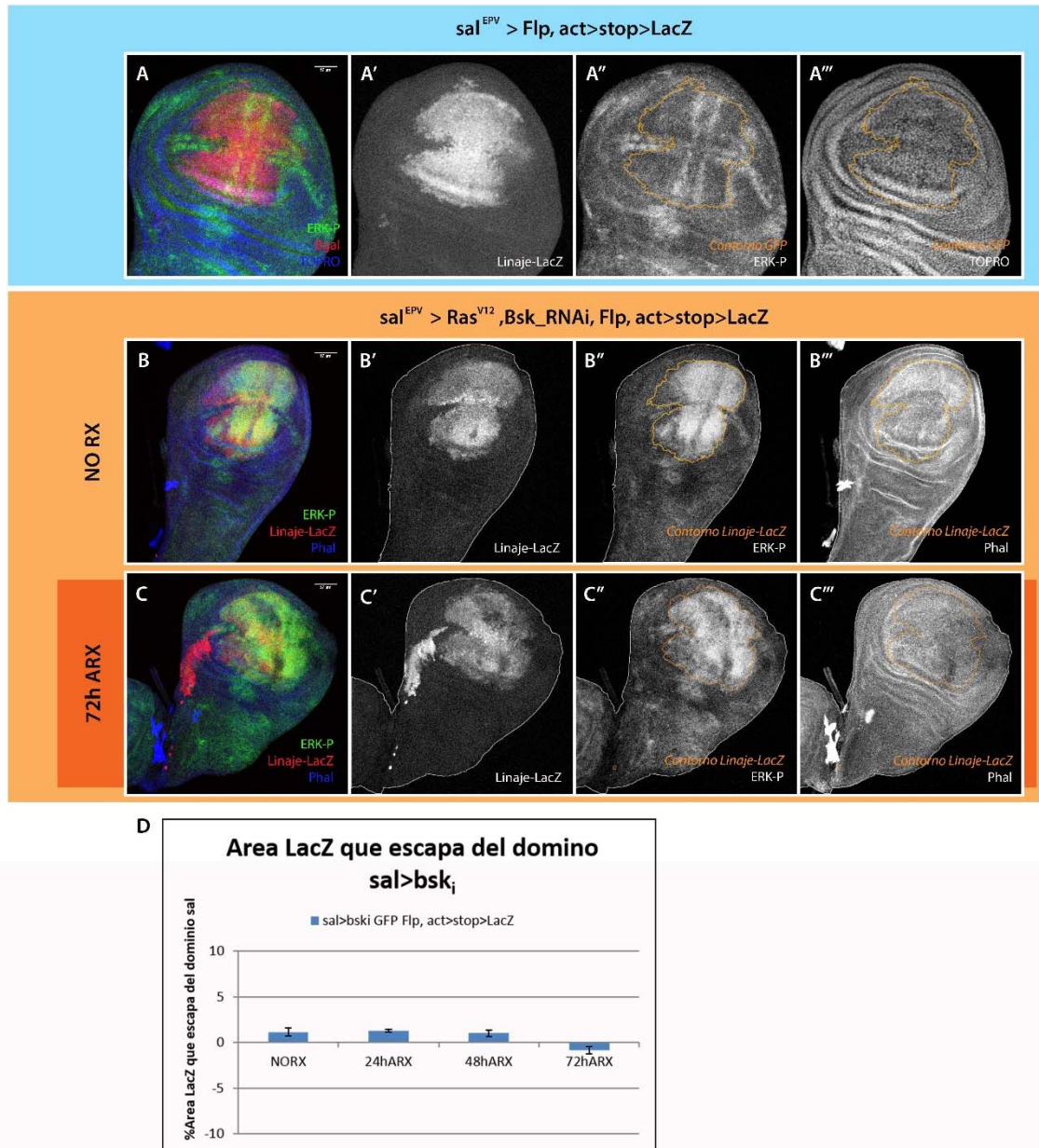
## RESULTADOS

De este modo, estamos inhibiendo la vía JNK dentro del dominio *sal*. Hemos generado larvas *dronc*<sup>-/-</sup>; *sal*<sup>EPV</sup> > *ras*<sup>V12</sup> GFP *puc14C*. A las 96h ARX observamos “pouches” ligeramente sobre-crecidos, aunque en menor medida que en los observados en *dronc*<sup>-/-</sup>; *sal*<sup>EPV</sup> > *ras*<sup>V12</sup> GFP, y que presentan además muchos menos pliegues de tejido en ese área. Además, el aspecto morfológico de los dominios *sal*<sup>EPV</sup> es bastante similar al silvestre, a diferencia de aquellos en los que no está inhibida la vía JNK, donde la forma del dominio *sal* no es

reconocible como tal y aparece en muchos casos con un aspecto bastante disgregado, como se puede ver en el canal verde (**Figura R18**). Hemos de tener en cuenta que en este experimento estamos inhibiendo la actividad de JNK dentro del dominio *sal*, pero no fuera del mismo. Estamos trabajando en fondo genético *dronc*<sup>-/-</sup> y, seguramente en este tejido externo al dominio, continúe habiendo persistencia de la actividad JNK que promueva la expansión del tejido del “pouch” que no es *sal*.



**Figura R18.** La supresión de la actividad JNK (mediante la expresión de *puc14C*) dentro del dominio *sal*<sup>EPV</sup>>*ras*<sup>V12</sup> en un fondo genético defectivo para la apoptosis (*dronc*<sup>-/-</sup>) inhibe parcialmente el sobre-crecimiento que se genera en respuesta a irradiación. Discos fijados 96h ARX. En verde están marcados los dominios *sal*<sup>EPV</sup> (GFP) y en azul TOPRO (marcaje de núcleos). (A) Disco *dronc*<sup>-/-</sup>; *sal*<sup>EPV</sup> > GFP *ras*<sup>V12</sup>: *w*; *sal*<sup>EPV</sup>, UAS-GFP / +; *dronc*<sup>L24</sup> / UAS-*ras*<sup>V12</sup>, *dronc*<sup>L29</sup> (B) Disco *dronc*<sup>-/-</sup>; *sal*<sup>EPV</sup> > GFP *ras*<sup>V12</sup> *Puc14C*: *w*; *sal*<sup>EPV</sup>, UAS-GFP / UAS-*puc14C*; *dronc*<sup>L24</sup> / UAS-*ras*<sup>V12</sup>, *dronc*<sup>L29</sup>. Compárese el tamaño y la forma de los dominios *sal*<sup>EPV</sup> > GFP *ras*<sup>V12</sup> marcados en verde, así como el tamaño de los “*notum*”; puede apreciarse a simple vista una mayor cantidad de pliegues en A”. (Imágenes cedidas por Noelia Pinal)



**Figura R19.** La supresión de la vía JNK (mediante Bsk\_RNAi) en dominios sal<sup>EPV</sup>>ras<sup>V12</sup> evita la motilidad de las células ras<sup>V12</sup> en respuesta a irradiación. Para visualizar el dominio sal<sup>EPV</sup>>ras<sup>V12</sup> utilizamos el anticuerpo anti-fosfo-ERK, que detecta la activación de la vía Ras. (A) Disco sal<sup>EPV</sup> > Flp; act5C>stop>LacZ; w; sal<sup>EPV</sup>/+; act5C>stop>LacZ, UAS-Flp/UAS-bsk\_RNAi teñido para fosfo-ERK (ERK-P) en verde, para  $\beta$ gal en rojo (linaje-LacZ) y con TOPRO para marcar los núcleos en azul. (A'') Obsérvese la existencia de un patrón de expresión para ERK-P en el disco de ala silvestre, presente en dos bandas que flanquean en borde D/V, otras dos bandas paralelas que flanquean el borde A/P y otra banda paralela a estas flanqueando el borde posterior del dominio sal. (B, C) Evolución temporal del linaje-LacZ en respuesta a una dosis elevada de irradiación (3000R) en discos sal<sup>EPV</sup> > ras<sup>V12</sup>, Bsk-RNAi, Flp; act5C>stop>LacZ; w; sal<sup>EPV</sup>/UAS-ras<sup>V12</sup>; act5C>stop>LacZ, UAS-Flp/UAS-bsk\_RNAi. Marcaje en verde para ERK-P (dominio sal<sup>EPV</sup>), en rojo para  $\beta$ gal (linaje-LacZ) y en azul para Phal (contorno celular). (B) Disco control NO RX. (C) Disco RX fijado 72h ARX. Compárese B y C, el linaje LacZ y el dominio sal<sup>EPV</sup> > ras<sup>V12</sup> Bsk-RNAi marcado por ERK-P son coincidentes. (D) Representación gráfica de la evolución temporal en el % linaje-LacZ que escapa del dominio sal<sup>EPV</sup> > ras<sup>V12</sup> Bsk-RNAi. Puede observarse que la contribución del linaje al tejido externo apenas supera el 2% tanto en el caso de los discos si irradiar como en los irradiados

A continuación diseñamos otro experimento para testar el papel de la actividad JNK en la expansión del linaje-LacZ en dominios  $sal^{EPV} > ras^{V12}$ . Como el número de trans-genes con UAS ya era elevado en el experimento, suprimimos el marcaje del dominio con GFP. Y en su lugar utilizamos el anticuerpo anti-ERK-fosforilado (anti-ERK-P) para visualizar el dominio  $sal^{EPV} > ras^{V12}$ . ERK-P marca la activación por fosforilación de la proteína kinasa ERK perteneciente a la ruta MAPK, a través de la cual opera la vía Ras (**Ver Figura I5**). En un disco silvestre, ERK-P tiene un patrón en bandas como el que se muestra en la **figura R19.A**. Pero como vemos, reconoce eficientemente el dominio  $sal^{EPV} > ras^{V12}$ . En nuestro caso, estamos activando constitutivamente la vía Ras, con lo que, se está produciendo en estas células la activación de la vía MAPK de manera continua y podemos

detectarla mediante este anticuerpo que reconoce la región fosforilada de la proteína ERK. Las larvas utilizadas contienen los siguientes elementos genéticos  $sal^{EPV} > ras^{V12}$ , *bsk*-RNAi, Flp; *act5C*>stop>LacZ. El genotipo de estas larvas es: w;  $sal^{EPV}/UAS-ras^{V12}$ ; *act5C*>stop>LacZ, UAS-Flp/UAS-*bsk*-RNAi. Realizando un "timing" para el tratamiento de irradiación y para las fijaciones, similar al de experimentos anteriores, observamos que, en ausencia de actividad persistente de la vía JNK, (debido a la construcción *bsk*-RNAi, ver referencia en Materiales y Métodos) no hay una expansión del linaje-LacZ a partir del dominio *sal*. Este resultado sugiere que el mantenimiento prolongado de la actividad JNK dentro del dominio *sal* es responsable de incrementar la proliferación y el movimiento de las células  $ras^{V12}$  (**figura R19**).

## DISCUSIÓN



## 1. Características de las células que mantienen actividad constitutiva de la vía Ras

La mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster*, ha sido un organismo modelo ampliamente utilizado en la exploración de los mecanismos subyacentes al cáncer así como la aproximación a distintos procesos terapéuticos para tratar de frenar el desarrollo tumoral. Existen cientos de herramientas genéticas que se han desarrollado en este sistema modelo que ofrece un potencial de estudio detallado de las interacciones entre células, tejidos y genes. El estudio del cáncer tiene todavía muchas incógnitas: los estudios basados en cultivos de líneas celulares no han servido como predictores de relevancia clínica y los modelos de ratón están todavía desarrollando sofisticadas herramientas genéticas para recrear toda la complejidad de la tumorigenesis.

Es decir, como primera aproximación a la exploración de los mecanismos celulares y genéticos que se da en el desarrollo de tumores dentro de un tejido en el que conviven células sanas y células tumorales, *Drosophila* es muy útil.

En esta tesis hemos estudiado una mutación activadora de la vía Ras. En uno de cada tres tumores humanos aparecen mutaciones activadoras en uno de los tres ortólogos del gen *ras* (Fernandez-Medarde and Santos 2011). De hecho, las mutaciones en los diferentes genes *ras* son frecuentes en algunos de los cánceres con peor pronóstico, como los carcinomas de colon o páncreas (Karnoub and

Weinberg 2008). Los alelos oncogénicos hallados en estos tumores poseen una secuencia aminoacídica idéntica a la de los alelos silvestres excepto en mutaciones puntuales que resultaban del reemplazamiento de un aminoácido, la más frecuente adefecta al residuo 12, *ras*<sup>X12</sup> (siendo X cualquier aminoácido excepto prolina) (Capon et al. 1983; Reddy et al. 1982; Tabin et al. 1982; Taparowsky et al. 1982).

La mosca del vinagre posee un solo homólogo de las tres isoformas del gen *ras* presentes en mamíferos (Simon et al. 1991): *Dras1 (ras)*. Hemos generado un modelo en *Drosophila* para reflejar la mutación *ras*<sup>X12</sup>, valiéndonos del transgén artificial *ras*<sup>V12</sup> (Barbacid 1987) que confiere actividad constitutiva de la vía Ras, mediante una construcción UAS-*ras*<sup>V12</sup>.

En este trabajo no hemos estudiado la activación constitutiva de la vía Ras en el organismo completo sino en clones o en el dominio *sal* del disco imaginal de ala de *Drosophila* (usando el “driver” *sal*<sup>EPV</sup>-Gal4, al cual llamamos *sal*<sup>EPV</sup>). De esta forma podemos estudiar el comportamiento de estas células en relación con las células silvestres que las rodean, emulando una situación probablemente mucho más parecida a la forma en la que se comienzan a formar los tumores en humanos, en la que tiene lugar una mutación somática en el organismo a partir de la cual podría originarse un tumor. Los clones nos ayudan a entender cómo se relacionan un pequeño número de células *ras*<sup>V12</sup> con sus vecinas y podemos observar cómo evolucionan a lo largo del tiempo

y en respuesta a distintos tratamientos. La línea *sal*<sup>EPV</sup> nos permite estudiar la relación de un grupo grande de células que activan de forma constitutiva la vía Ras (el dominio *sal* constituye aproximadamente el 20% del disco imaginal de ala). Las peculiaridades de esta línea están descritas en Material y Métodos.

Los estudios previos llevados a cabo en *Drosophila* revelan que la sobreexpresión de la forma mutante *ras*<sup>V12</sup> es insuficiente para inducir la formación de tumores invasivos en el tejido imaginal. La expresión del transgén *ras*<sup>V12</sup> en el borde antero-posterior del disco de ala produce crecimiento hiperplásico del tejido, pues es suficiente para incrementar el tamaño del órgano y la tasa proliferativa de sus células y además induce apoptosis que han sido interpretada como apoptosis no-autónoma. Complementariamente, observan que este fenotipo se exacerba al incrementar la dosis de *ras*<sup>V12</sup> (Karim and Rubin 1998). Esta región constituye el principal centro organizador de patrón del disco: sus células a su vez secretan y reciben altas concentraciones de Dpp. Por lo tanto, el efecto descrito podría deberse a efectos no-autónomos independientes de la activación constitutiva de la vía Ras, ya que está descrito que la sobreexpresión de Dpp causa crecimiento hiperplásico (Burke and Basler 1996).

Para poder analizar los efectos autónomos de la vía se aborda el análisis de *ras*<sup>V12</sup> en clones. En este contexto las células *ras*<sup>V12</sup> poseen una tasa proliferativa similar a la del tejido silvestre, tienen un tamaño celular mayor y aumentan los niveles de dMyc de

manera autónoma (Prober and Edgar 2000). Nuestros resultados para los clones *ras*<sup>V12</sup> son muy similares a los obtenidos por Prober y Edgar 2000: las células aumentan de tamaño, hay sobreexpresión de dMyc y el índice proliferativo es prácticamente normal. Sin embargo no encontramos que la expresión de *ras*<sup>V12</sup> ni en clones ni en dominios *sal* induzca apoptosis, como describen Karim y Rubin 1998. El resultado que ellos obtienen de la expresión de *ras*<sup>V12</sup> mediante el driver dpp-Gal4 en el que ven incremento proliferativo, sobrecrecimiento e inducción de apoptosis, es difícil de explicar en base a que *ras*<sup>V12</sup> no induce proliferación. Esta diferencia podría deberse a que los niveles de expresión de *ras*<sup>V12</sup> que genera esta línea Gal4 son muy elevados, llegando a dosis tóxicas para la célula que podrían suponer una situación de estrés para la célula e inducir la apoptosis de la misma. Como ya hemos expuesto, las células apoptóticas emiten mitógenos Dpp y Wg (Perez-Garijo et al. 2004; Ryoo et al. 2004). De esta forma se podría hacer incrementar el nivel de Dpp que causa en última instancia la hiperplasia (Burke and Basler 1996). En el trabajo de Karim y Rubin 1998, la duplicación de la dosis de *ras*<sup>V12</sup>, además de inducir drásticos sobrecrecimientos en el tejido imaginal, aumenta los niveles de apoptosis incluso de manera autónoma. Probablemente podríamos encontrar algo parecido si expresamos dos dosis de *ras*<sup>V12</sup> en clones o dominios *sal*.

Algunos autores han extrapolado estos datos y han propuesto que la activación sostenida de la vía Ras induce supercompetición (revisado en Amoyel and Bach



2014). Su sugerencia se basa en que las células *ras<sup>V12</sup>* inducen apoptosis de manera no-autónoma, como describen Karim y Rubin 1998, y a que además sobre-expresan dMyc (Prober and Edgar 2000), de modo que interpretan que potencialmente podrían eliminar por competición celular a las células silvestres. El fenómeno de super-competición celular fue descrito inicialmente para el proto-oncogen dMyc: consiste en que las células silvestres son eliminadas por apoptosis por células que sobre-expresan dMyc (de la Cova et al. 2004; Moreno and Basler 2004). Sin embargo en los trabajos en los que se describe el fenómeno de la supercompetición, se muestra la generación de clones de mucho mayor tamaño de las células “ganadoras” (4xMyc) respecto a las células silvestres “perdedoras” (con sólo 2xMyc, la dosis silvestre de Myc) pero, sin embargo, no muestran inducción de apoptosis en el tejido silvestre (de la Cova et al. 2004; Moreno and Basler 2004). Nosotros no encontramos en este trabajo apoptosis no-autónoma asociada al tejido *ras<sup>V12</sup>* que, en caso de ocurrir la supercompetición se debería observar. Por otro lado, los autores del fenómeno de supercompetición explican los procesos de invasividad tumoral, en el que las células tumorales eliminarían por apoptosis a las células sanas, en base a este modelo. Existen diferentes ejemplos en desarrollo de tumores invasivos en *Drosophila* en los que la ocurrencia de apoptosis en el borde del tumor ha sido interpretada erróneamente como apoptosis no-autónoma. Es el caso de los tumores generados a partir de clones *tsg ras<sup>V12</sup>*. Esa apoptosis deriva de las células tumorales que siguen

siendo eliminadas por las células sanas y el proceso de invasividad puede explicarse en base a la hipótesis del microambiente de células mutantes que se confieren mutuamente protección de grupo (revisado en Morata and Ballesteros-Arias 2015).

Por último, nuestros resultados sugieren que la expresión de *ras<sup>V12</sup>* tiene un efecto en motilidad celular. Existe evidencia en la literatura que implica la actividad de la vía Ras en migración celular, que participa tanto en migración traqueal (Reichman-Fried et al. 1994) como en la migración de las “border cells” en la cámara del huevo de *Drosophila melanogaster* (Lee et al. 1996) y en el cerrado de heridas en mamíferos (Sosnowski et al. 1993). Como hemos señalado, el dominio *sal* es un “dominio de linaje abierto”. Al expresar *ras<sup>V12</sup>*, el marcaje del linaje del dominio revela que hay una contribución de alrededor del 17% del tamaño del disco formado por células que originalmente expresaban *ras<sup>V12</sup>* pero que posteriormente dejan de hacerlo, mientras que en controles es de 6% (**Figura R5**). Esta contribución podría explicarse por el mayor tamaño de las células que expresan *ras<sup>V12</sup>*: con un número menor de células de mayor tamaño se cubre el 20% del área total que ocupa el dominio *sal* en un número menor de divisiones celulares; además, la tasa proliferativa es la misma para las células silvestres y las *ras<sup>V12</sup>*. Sin embargo, una explicación alternativa podría ser que las células con activación constitutiva de la vía Ras posean mayor capacidad de movilidad dentro del epitelio que las células silvestres. Las células *ras<sup>V12</sup>* podrían en este supuesto tener una

capacidad invasiva mayor. La invasividad es otra de las características comunes compartidas por las células tumorales. Tres de nuestros resultados experimentales apoyan esta idea: en primer lugar, hay un incremento autónomo de los niveles de MMP1 extracelular en los clones *ras<sup>V12</sup>* (**Figura R11.A y B**), las MMP son enzimas que degradan la matriz extracelular y su función es fundamental para permitir que las células puedan moverse. En *Drosophila*, se sabe que *ras<sup>V12</sup>* activa la vía JNK vía RalGDS (Sawamoto et al. 1999) (**Figura I6**) y JNK, a su vez, está relacionada con procesos de migración celular (Ma et al. 2014; Vidal 2010). En apoyo a este argumento, nuestro segundo resultado, la inhibición de la ruta JNK mediante una construcción que elimina el gen *bsk* (*bsk<sub>RNAi</sub>*), es suficiente para impedir la expansión del linaje celular procedente de dominios *sal* a partir de células *ras<sup>V12</sup>* (**Figura R19. B y D**) sugiriendo que en ausencia de actividad JNK no es posible la motilidad de estas células. Y por último, aunque en respuesta a irradiación la expansión del linaje celular de *sal* es significativamente grande (**Figura R12**), no puede explicarse totalmente por la mayor contribución que pueden hacer las células protegidas frente a la apoptosis a la repoblación del tejido silvestre eliminado por efecto de la irradiación (no observamos expansión del linaje marcado a partir de dominios *sal* que sobre-expresan Diap1 en respuesta a irradiación) (**Figura R13**).

Tomando en conjunto estos resultados proponemos que la activación constitutiva de la vía Ras induce secreción de MMP1, a través de

la activación autónoma de la vía JNK, al medio extracelular lo que degrada la matriz extracelular y posibilita así el incremento de motilidad observado en estas células.

## 2. Respuesta de las células *ras<sup>V12</sup>* a irradiación

La propiedad especial que hace potencialmente tumorigénicas a las células *ras<sup>V12</sup>* es que son refractarias a la apoptosis. Que una célula tenga esta propiedad puede significar que es capaz de iniciar la vía de la apoptosis, por ejemplo, en respuesta a un daño, pero no de culminarla. Cuando la vía Ras está activa existe una represión transcripcional (Kurada and White 1998) y postranscripcional (Bergmann et al. 1998), del gen proapoptótico *hid* capaz de evitar en muchos contextos la muerte celular. Una de las características comunes compartidas por las células tumorales es precisamente la evasión de la apoptosis (Hanahan and Weinberg 2011). En esta tesis vamos a proponer un nuevo significado a la característica de protección frente a la apoptosis en tumorigénesis que pensamos que podría tener importantes implicaciones fisiológicas.

Utilizamos los rayos X para inducir muerte generalizada sobre discos imaginales que poseen un tejido mosaico formado por células normales y células *ras<sup>V12</sup>*. Una dosis elevada de rayos X (3000R) induce la muerte de más del 50% de las células del disco imaginal de ala (Haynie and Bryant 1977). En un tejido silvestre las células apoptóticas tardan en desaparecer del tejido aproximadamente 72h tras el tratamiento de irradiación siendo las 24h

ARX el momento de máxima actividad apoptótica en el disco imaginal (Perez-Garijo et al. 2004). En nuestros experimentos encontramos a tiempos tardíos (96h ARX) tras la irradiación, persistencia de apoptosis no-autónoma asociada al borde de los clones *ras<sup>V12</sup>*, momento en el cual las células apoptóticas deberían haber desaparecido del tejido imaginal (**Figura R9**). Una posible explicación es que la actividad persistente de JNK dentro de las células de los clones esté estimulando la muerte por apoptosis de las células silvestres que los rodean. En situaciones en las que se produce en el tejido apoptosis masiva, como la irradiación o la inducción de una herida, genera una ola de transmisión de la actividad JNK mediante la difusión del ligando Eiger (Perez-Garijo et al. 2013; Wu et al. 2010). Una posibilidad sería que las células “apoptóticas”, que tienen una actividad mantenida en el tiempo de la vía JNK, dentro del tejido *ras*, esté a su vez reactivando la muerte de las células vecinas. Por otro lado, resulta curioso que la señalización mitogénica mantenida que se genera en estas situaciones tan sólo induce al sobrecrecimiento de las células protegidas frente a la apoptosis tanto las *ras<sup>V12</sup>* (**Figuras R8, R12 y R14**) como las *dronc<sup>-/-</sup>* (**Figuras R15 y R16**), pero no de las células silvestres que, sin embargo, mueren por apoptosis (**Figura R9**) como acabamos de discutir, contribuyendo a su vez con la señalización mitogénica derivada de la apoptosis e incrementar el sobrecrecimiento de las células protegidas.

En apoyo de esta hipótesis, existen un par de estudios llevados a cabo en *Mus musculus*, revela que la señalización mediada por prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) a partir de un pequeño número de células tumorales apoptóticas resultantes del tratamiento con radioterapia es capaz de estimular la rápida repoblación de un tumor (Huang et al. 2011; Ford et al. 2015).

Nuestros resultados tanto en clones y dominios que expresan *ras<sup>V12</sup>* como en un fondo genético *dronc<sup>-/-</sup>*, revelan ese mecanismo de mantenimiento de la vía JNK dentro de las células refractarias a la apoptosis del cual desconocemos su funcionamiento. Se genera una situación comparable a la que se produce con las “undead cells” (Perez-Garijo et al. 2004; Ryoo et al. 2004). La actividad persistente de este estado de no-muerte se ha explicado mediante el modelo del bucle apoptótico (Shlevkov and Morata 2012) (**Ver figura I10 de la introducción**): Ante una situación en la que la caspasa Drice está inhibida por P35, hay una reactivación de la vía JNK mediada por Dronc. En nuestros experimentos, sin embargo, *ras<sup>V12</sup>* inhibe la cascada apoptótica a nivel del gen pro-apoptótico *hid* mientras que el mutante *dronc<sup>-/-</sup>* inhibe la vía a nivel de la caspasa iniciadora Dronc, valga la redundancia. En el modelo se recoge también otro punto adicional de retroalimentación positiva de la vía, por la activación recíproca entre la ruta JNK y Dmp53. Durante la escritura de esta tesis se ha abordado experimentalmente en el laboratorio la posibilidad de que el mecanismo de mantenimiento de actividad JNK que

observamos en las células refractarias a la apoptosis opere a través de DmP53, pero a la luz de los resultados obtenidos, parece que en ausencia de DmP53 seguimos observando actividad persistente de JNK, también en fondo genético *dronc*<sup>-/-</sup> (comunicación personal de Noelia Pinal). Otra posibilidad que barajamos es que el mecanismo opere a través de la vía JAK/STAT, como sugiere el trabajo de Wu et al. 2010. Recientemente hemos observado que la forma dominante negativa del receptor Domeless (Dome<sup>DN</sup>) suprime la actividad persistente de JNK en este contexto (comunicación personal de Noelia Pinal).

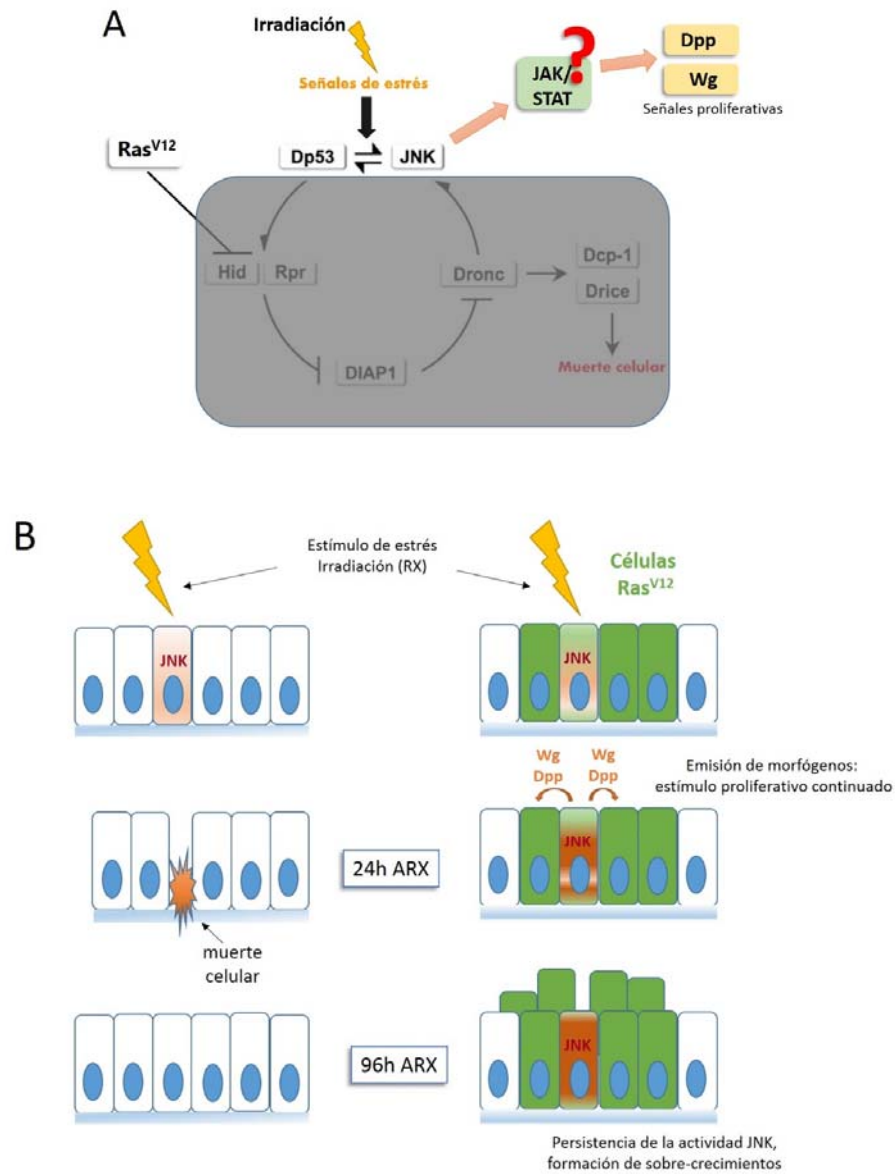
Por último, parece que las células *ras*<sup>V12</sup> generan sobrecrecimientos de mayor tamaño las células *dronc*<sup>-/-</sup>. El mayor potencial tumorigénico de las células *ras*<sup>V12</sup> podría ser debido al carácter pleiotropico Ras, que es capaz de operar a través de distintas vías y por tanto de afectar a distintos procesos. Una posible explicación es que las células *ras*<sup>V12</sup>, debido a que no son células quiescentes sino que son estimuladas a activar el ciclo celular haciéndolas pasar de la fase G1 a S, y se encuentran paradas en fase G2 del ciclo celular, probablemente son más propensas a responder ante las señales mitogénicas que las demás células (Prober y Edgar, 2000). Las células con actividad *ras*<sup>V12</sup> poseen altos valores de dMyc los cuales confieren mayor actividad metabólica (Conacci-Sorrell et al. 2014).

### 3. Modelo general de tumorigénesis en células *ras*<sup>V12</sup>

En respuesta a irradiación, el tejido *ras*<sup>V12</sup> incrementa notablemente su tamaño. También observamos grandes sobrecrecimientos del tejido en un fondo genético *dronc*<sup>-/-</sup>. En todos estos casos, existen en el tejido unas células refractarias a la apoptosis (*ras*<sup>V12</sup> inhibe la vía apoptótica a nivel de *hid* (Bergmann et al. 1998; Kurada and White 1998) y las células *dronc*<sup>-/-</sup> tienen inhibida la vía apoptótica a ese nivel). Las células refractarias a la apoptosis van a permitir, por medio de un mecanismo desconocido, la actividad persistente de la vía JNK y la formación de sobrecrecimientos en el tejido imaginal.

El potencial tumorigénico de la actividad constitutiva de Ras reside fundamentalmente en hacer a estas células refractarias a la apoptosis. Ante la ocurrencia de un daño puntual, como lo es recibir una dosis elevada de irradiación con Rayos X y, probablemente de cualquier otro estímulo que suponga un estrés para las células larvarias, se induce la activación de la vía JNK. En células sanas esta activación induce la ruta apoptótica que desencadena en muerte celular, pero en células que no pueden morir, la activación de la vía JNK puede hacerse persistente dentro de ellas. Esta situación es muy parecida a la de las “undead cells” en la cual las células con actividad JNK secretan señales mitogénicas Wg y Dpp produciendo la inducción del crecimiento de las células vecinas (Perez-Garijo et al. 2004; Ryoo et al. 2004) (Figura D1).

En el modelo clásico de tumorigénesis se entiende que las células tumorales que tienen alta capacidad proliferativa se hacen resistentes a la apoptosis (Hanahan and Weinberg 2011), lo cual las hace insensibles a los tratamientos antitumorales como la quimio o la radioterapia. A la luz de nuestros resultados nosotros proponemos un modelo en el que puede suceder lo contrario: son las células resistentes a la apoptosis las que se hacen cancerígenas. Un único estímulo de estrés sobre estas células refractarias a la apoptosis, ponen en marcha un mecanismo de mantenimiento de la vía JNK, capaz de inducir la señalización mitogénica continuada desde estas células hacia el tejido circundante refractario a la apoptosis y estimular así un exceso de proliferación de las células que van a dar lugar a un tumor.



**Figura D1. Modelo general de tumorigénesis para las células *ras<sup>V12</sup>*.** (A) Esquema en base al modelo del bucle apoptótico de la respuesta molecular que probablemente se esté dando dentro de la célula *ras* en respuesta a irradiación. (B) Esquema de la respuesta a irradiación en un epitelio no mutante (izquierda) y un epitelio con células *ras* (derecha). Un solo evento de estrés puede desencadenar en estas células la activación mantenida de la vía JNK.

## CONCLUSIONES





1. Las células *ras<sup>V12</sup>* son de mayor tamaño que las silvestres, incrementan autónomamente los niveles de dMyc y presentan propiedades diferentes de adhesión con las células silvestres, son extruidas del epitelio formando vesículas que no perturban la arquitectura monocapa del epitelio imaginal y, no presentan variaciones en la tasa proliferativa respecto al tejido silvestre. Por tanto, los clones de células *ras<sup>V12</sup>* no manifiestan un fenotipo hiperplásico,
2. La activación constitutiva de la vía Ras en el tejido imaginal no genera apoptosis de forma no-autónoma, por tanto no puede afirmarse que la activación sostenida de la vía induzca super-competición celular.
3. Nuestros resultados sugieren que activación constitutiva de la vía Ras confiere a las células mayor capacidad de motilidad.
4. Las células *ras<sup>V12</sup>* son refractarias a la apoptosis inducida por irradiación, es decir, están protegidas de la muerte celular inducida por irradiación con rayos-X.
5. Una dosis elevada de irradiación con rayos-X (3000R) es suficiente para inducir el crecimiento tumoral en el tejido *ras<sup>V12</sup>*.
6. Las células refractarias a la apoptosis (*ras<sup>V12</sup> y/o dronc<sup>-/-</sup>*), en respuesta a irradiación, activan la ruta JNK del mismo modo que las silvestres. Sin embargo, al contrario de las silvestres, la actividad JNK se hace permanente en las células *ras<sup>V12</sup> y/o dronc<sup>-/-</sup>*.
7. La actividad persistente de la vía JNK en las células *ras<sup>V12</sup> y/o dronc<sup>-/-</sup>* genera una señalización proliferativa, mediada por Wg y Dpp, que da lugar a sobrecrecimientos tumorales
8. La visión clásica sobre las células cancerígenas es que acaban adquiriendo la característica de evasión de la apoptosis. Sin embargo, basado en este mecanismo de perpetuación de la actividad JNK derivado de la inhibición de la muerte celular, proponemos que es la característica de evasión de la apoptosis la que hace a estas células cancerígenas, pues son susceptibles a transformación tumoral que se origina por un único estímulo de estrés.



## **ABREVIATURAS**

## ABREVIATURAS

<b>A</b>	Anterior	<i>en</i>	<i>engrailed</i>
<b>AEL</b>	Tras la puesta de huevos, del inglés "After Egg Laying"	<b>FGFR</b>	Fibroblast Growth Factor Receptor
<b>AHS</b>	Después del choque térmico, del inglés "After Heat Shock"	<b>ERK-P</b>	ERK-Phosphoridado
<i>ap</i>	<i>apterous</i>	<b>Flp</b>	Flipasa
<b>A/P</b>	Antero-Posterior	<b>FRT</b>	"Flipase Recombination Target"
<i>arm</i>	<i>armadillo</i>	<b>GAP</b>	Proteína Activadora de GTPasas, del inglés "GTPase Activating Protein"
<b>ARX</b>	Después de irradiar, del inglés After Radiation X	<b>GDP</b>	Guanosin-5'-Di-Phosphato
<b>BSA</b>	Albúmina de Suero Bovina	<b>GEF</b>	Factor liberador de GDP, del inglés "Guanosin Exchange Factor"
<i>bth</i>	<i>breathless</i>	<b>GFP</b>	"Green Fluorescent Protein"
<i>bsk</i>	<i>basket</i>	<b>GTP</b>	Guanosin-5'-Tri-Phosphato
<b>Casp3</b>	Caspasa-3 Humana	<b>hDLG1</b>	human Disc Large 1, homólogo en humano de <i>dlg</i>
<i>Ck</i>	<i>Crinkle</i>	<i>hep</i>	<i>hemipterous</i>
<i>cycE</i>	<i>ciclina E</i>	<i>hid</i>	<i>head involution defective</i>
<b>D</b>	Dorsal	<i>hh</i>	<i>hedgehog</i>
<b>D.T.</b>	Tasa proliferativa, del inglés "Doubling Time"	<b>Hpo</b>	Hippo
<i>dlg</i>	<i>disc large</i>	<b>hs</b>	promotor de "Heat Shock Protein"
<i>Dmp53</i>	<i>Drosophila melanogaster p53</i>	<i>Hugl-1</i>	ortólogo en humano de <i>Igl</i>
<i>dMyc</i>	<i>Drosophila Myc</i>	<b>IAPs</b>	"Inhibitor of Apoptosis Proteins"
<i>dpp</i>	<i>decapentaplegic</i>		
<b>EGFR</b>	Epidermal Growth Factor Receptor		

<b>JNK</b>	Jun N-terminal Kinasa	<i>sal</i>	<i>spalt</i>
<b>LacZ/β-Gal</b>	β-Galatosidasa	<b>Sav</b>	Salvador
<i>lgl</i>	<i>lethal giant larvae</i>	<i>scrib</i>	<i>scribble</i>
<i>M</i>	<i>Minute</i>	<b>Sd</b>	Scalloped
<b>MAPK</b>	MAP Kinasa	<i>skl</i>	<i>sickle</i>
<b>MARCM</b>	“Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker”	<b>tsg</b>	Genes supresores de tumores, del inglés “Tumor Suppressor Genes”
<b>MMP1</b>	Metaloproteasa 1	<i>tub</i>	<i>tubulina</i>
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud	<b>TUNEL</b>	TdT-mediated dUTP Nick End- Labelling
<b>P</b>	Posterior	<b>UAS</b>	“Upstream Activating Sequence”
<b>PH3</b>	Fosfo-Histona-3	<b>V</b>	Ventral
<b>Phal</b>	Faloidina, del inglés Phaloidina	<i>w</i>	<i>white</i>
<i>puc</i>	<i>puckered</i>	<i>wg</i>	<i>wingless</i>
<i>ras</i>	<i>“rat sarcoma virus”</i>	<b>Wts</b>	Warts
<i>ras<sup>V12</sup></i>	mutación activadora del gen ras	<i>y</i>	<i>yellow</i>
<b>RNA<sub>i</sub></b>	RNA de interferencia	<i>yki</i>	<i>yorkie</i>
<i>rpr</i>	<i>reaper</i>		
<b>RTK</b>	Receptor Tirosin-Kinasa		
<b>RX</b>	Irradiado con Rayos X		





## **BIBLIOGRAFIA**



- Adams, M. D., et al. (2000), 'The genome sequence of *Drosophila melanogaster*', *Science*, 287 (5461), 2185-95.
- Amoyel, M. and Bach, E. A. (2014), 'Cell competition: how to eliminate your neighbours', *Development*, 141 (5), 988-1000.
- Ballesteros-Arias, L., Saavedra, V., and Morata, G. (2014), 'Cell competition may function either as tumour-suppressing or as tumour-stimulating factor in *Drosophila*', *Oncogene*, 33 (35), 4377-84.
- Barbacid, M. (1987), 'ras genes', *Annu Rev Biochem*, 56, 779-827.
- Barres, B. A., et al. (1992), 'Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage', *Cell*, 70 (1), 31-46.
- Basler, K. and Struhl, G. (1994), 'Compartment boundaries and the control of *Drosophila* limb pattern by hedgehog protein', *Nature*, 368 (6468), 208-14.
- Bergantinos, C., Corominas, M., and Serras, F. (2010a), 'Cell death-induced regeneration in wing imaginal discs requires JNK signalling', *Development*, 137 (7), 1169-79.
- Bergantinos, C., et al. (2010b), 'Imaginal discs: Renaissance of a model for regenerative biology', *Bioessays*, 32 (3), 207-17.
- Bergmann, A., et al. (1998), 'The *Drosophila* gene *hid* is a direct molecular target of Ras-dependent survival signaling', *Cell*, 95 (3), 331-41.
- Bilder, D. (2004), 'Epithelial polarity and proliferation control: links from the *Drosophila* neoplastic tumor suppressors', *Genes Dev*, 18 (16), 1909-25.
- Bosch, M., et al. (2005), 'JNK signaling pathway required for wound healing in regenerating *Drosophila* wing imaginal discs', *Dev Biol*, 280 (1), 73-86.
- Brand, A. H. and Perrimon, N. (1993), 'Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes', *Development*, 118 (2), 401-15.
- Brodsky, M. H., et al. (2000), '*Drosophila* p53 binds a damage response element at the reaper locus', *Cell*, 101 (1), 103-13.
- Brumby, A. M. and Richardson, H. E. (2003), 'scribble mutants cooperate with oncogenic Ras or Notch to cause neoplastic overgrowth in *Drosophila*', *EMBO J*, 22 (21), 5769-79.
- Bryant, P. J. and Schubiger, G. (1971), 'Giant and duplicated imaginal discs in a new lethal mutant of *Drosophila melanogaster*', *Dev Biol*, 24 (2), 233-63.
- Burke, R. and Basler, K. (1996), 'Dpp receptors are autonomously required for cell proliferation in the entire developing *Drosophila* wing', *Development*, 122 (7), 2261-9.
- Capon, D. J., et al. (1983), 'Complete nucleotide sequences of the T24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue', *Nature*, 302 (5903), 33-7.
- Claveria, C., et al. (2013), 'Myc-driven endogenous cell competition in the early mammalian embryo', *Nature*, 500 (7460), 39-44.
- Cohen, B., Wimmer, E. A., and Cohen, S. M. (1991), 'Early development of leg and wing primordia in the *Drosophila* embryo', *Mech Dev*, 33 (3), 229-40.
- Cohen, B., et al. (1992), 'apterous, a gene required for imaginal disc development in *Drosophila* encodes a member of the LIM family of developmental regulatory proteins', *Genes Dev*, 6 (5), 715-29.
- Chang, E. H., et al. (1982), 'Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79 (16), 4848-52.
- Conacci-Sorrell, M., McFerrin, L., and Eisenman, R. N. (2014), 'An overview of MYC and its interactome', *Cold Spring Harb Perspect Med*, 4 (1), a014357.
- de la Cova, C., et al. (2004), '*Drosophila* myc regulates organ size by inducing cell competition', *Cell*, 117 (1), 107-16.
- DeFeo, D., et al. (1981), 'Analysis of two divergent rat genomic clones homologous to the transforming gene of Harvey murine sarcoma virus', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78 (6), 3328-32.

- Der, C. J., Krontiris, T. G., and Cooper, G. M. (1982), 'Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79 (11), 3637-40.
- Devergne, O., Ghiglione, C., and Noselli, S. (2007), 'The endocytic control of JAK/STAT signalling in *Drosophila*', *J Cell Sci*, 120 (Pt 19), 3457-64.
- Diaz-Benjumea, F. J. and Cohen, S. M. (1993), 'Interaction between dorsal and ventral cells in the imaginal disc directs wing development in *Drosophila*', *Cell*, 75 (4), 741-52.
- Diaz-Benjumea, F. J. and Hafen, E. (1994), 'The sevenless signalling cassette mediates *Drosophila* EGF receptor function during epidermal development', *Development*, 120 (3), 569-78.
- Downward, J. (1997), 'Cell cycle: routine role for Ras', *Curr Biol*, 7 (4), R258-60.
- Ellis, H. M. and Horvitz, H. R. (1986), 'Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*', *Cell*, 44 (6), 817-29.
- Ellis, R. W., et al. (1982), 'Mouse cells contain two distinct ras gene mRNA species that can be translated into a p21 onc protein', *Mol Cell Biol*, 2 (11), 1339-45.
- Fernandez-Medarde, A. and Santos, E. (2011), 'Ras in cancer and developmental diseases', *Genes Cancer*, 2 (3), 344-58.
- Fischer, J. A., Eun, S. H., and Doolan, B. T. (2006), 'Endocytosis, endosome trafficking, and the regulation of *Drosophila* development', *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22, 181-206.
- Ford, C. A., et al. (2015), 'Oncogenic properties of apoptotic tumor cells in aggressive B cell lymphoma', *Curr Biol*, 25 (5), 577-88.
- Fortini, M. E., Simon, M. A., and Rubin, G. M. (1992), 'Signalling by the sevenless protein tyrosine kinase is mimicked by Ras1 activation', *Nature*, 355 (6360), 559-61.
- Frohnhofer, H. G., Lehmann, R., and Nusslein-Volhard, C. (1986), 'Manipulating the anteroposterior pattern of the *Drosophila* embryo', *J Embryol Exp Morphol*, 97 Suppl, 169-79.
- Fuchs, Y. and Steller, H. (2011), 'Programmed cell death in animal development and disease', *Cell*, 147 (4), 742-58.
- Fujita, Y. (2011), 'Interface between normal and transformed epithelial cells: a road to a novel type of cancer prevention and treatment', *Cancer Sci*, 102 (10), 1749-55.
- Garcia-Bellido, A. (1975), 'Genetic control of wing disc development in *Drosophila*', *Ciba Found Symp*, 0 (29), 161-82.
- Garcia-Bellido, A., Ripoll, P., and Morata, G. (1973), 'Developmental compartmentalisation of the wing disk of *Drosophila*', *Nat New Biol*, 245 (147), 251-3.
- Gardiol, D., et al. (2006), 'Human discs large and scrib are localized at the same regions in colon mucosa and changes in their expression patterns are correlated with loss of tissue architecture during malignant progression', *Int J Cancer*, 119 (6), 1285-90.
- Gateff, E. (1978), 'Malignant neoplasms of genetic origin in *Drosophila melanogaster*', *Science*, 200 (4349), 1448-59.
- Goulev, Y., et al. (2008), 'SCALLOPED interacts with YORKIE, the nuclear effector of the hippo tumor-suppressor pathway in *Drosophila*', *Curr Biol*, 18 (6), 435-41.
- Goyal, L., et al. (2000), 'Induction of apoptosis by *Drosophila* reaper, hid and grim through inhibition of IAP function', *EMBO J*, 19 (4), 589-97.
- Grifoni, D., et al. (2004), 'The human protein Hg1-1 substitutes for *Drosophila* lethal giant larvae tumour suppressor function in vivo', *Oncogene*, 23 (53), 8688-94.
- Guillen, I., et al. (1995), 'The function of engrailed and the specification of *Drosophila* wing pattern', *Development*, 121 (10), 3447-56.
- Hall, A., et al. (1983), 'Identification of transforming gene in two human sarcoma cell lines as a new member of the ras gene family located on chromosome 1', *Nature*, 303 (5916), 396-400.

- Hall, D. D., et al. (1998), 'Regulation of the Cln3-Cdc28 kinase by cAMP in *Saccharomyces cerevisiae*', *EMBO J*, 17 (15), 4370-8.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000), 'The hallmarks of cancer', *Cell*, 100 (1), 57-70.
- (2011), 'Hallmarks of cancer: the next generation', *Cell*, 144 (5), 646-74.
- Hay, B. A. and Guo, M. (2006), 'Caspase-dependent cell death in *Drosophila*', *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22, 623-50.
- Haynie, JohnL and Bryant, PeterJ (1977), 'The effects of X-rays on the proliferation dynamics of cells in the imaginal wing disc of *Drosophila melanogaster*', *Wilhelm Roux's archives of developmental biology*, 183 (2), 85-100.
- Herranz, H., et al. (2008), 'A Wingless and Notch double-repression mechanism regulates G1-S transition in the *Drosophila* wing', *EMBO J*, 27 (11), 1633-45.
- Herz, H. M., et al. (2006), 'vps25 mosaics display non-autonomous cell survival and overgrowth, and autonomous apoptosis', *Development*, 133 (10), 1871-80.
- Hogan, C., et al. (2009), 'Characterization of the interface between normal and transformed epithelial cells', *Nat Cell Biol*, 11 (4), 460-7.
- Huang, J., et al. (2005), 'The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* Homolog of YAP', *Cell*, 122 (3), 421-34.
- Huang, Q., et al. (2011), 'Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy', *Nat Med*, 17 (7), 860-6.
- Humbert, P. O., et al. (2008), 'Control of tumourigenesis by the Scribble/Dlg/Lgl polarity module', *Oncogene*, 27 (55), 6888-907.
- Igaki, T., Pagliarini, R. A., and Xu, T. (2006), 'Loss of cell polarity drives tumor growth and invasion through JNK activation in *Drosophila*', *Curr Biol*, 16 (11), 1139-46.
- Igaki, T., et al. (2009), 'Intrinsic tumor suppression and epithelial maintenance by endocytic activation of Eiger/TNF signaling in *Drosophila*', *Dev Cell*, 16 (3), 458-65.
- Kanda, H. and Miura, M. (2004), 'Regulatory roles of JNK in programmed cell death', *J Biochem*, 136 (1), 1-6.
- Karim, F. D. and Rubin, G. M. (1998), 'Ectopic expression of activated Ras1 induces hyperplastic growth and increased cell death in *Drosophila* imaginal tissues', *Development*, 125 (1), 1-9.
- Karnoub, A. E. and Weinberg, R. A. (2008), 'Ras oncogenes: split personalities', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9 (7), 517-31.
- Korshunov, A., Sycheva, R., and Golanov, A. (2006), 'Genetically distinct and clinically relevant subtypes of glioblastoma defined by array-based comparative genomic hybridization (array-CGH)', *Acta Neuropathol*, 111 (5), 465-74.
- Kurada, P. and White, K. (1998), 'Ras promotes cell survival in *Drosophila* by downregulating hid expression', *Cell*, 95 (3), 319-29.
- Lassmann, S., et al. (2007), 'Array CGH identifies distinct DNA copy number profiles of oncogenes and tumor suppressor genes in chromosomal- and microsatellite-unstable sporadic colorectal carcinomas', *J Mol Med (Berl)*, 85 (3), 293-304.
- Lawrence, P. A. and Struhl, G. (1996), 'Morphogens, compartments, and pattern: lessons from *drosophila*?', *Cell*, 85 (7), 951-61.
- Lee, T. and Luo, L. (1999), 'Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis', *Neuron*, 22 (3), 451-61.
- Lee, T., Feig, L., and Montell, D. J. (1996), 'Two distinct roles for Ras in a developmentally regulated cell migration', *Development*, 122 (2), 409-18.
- Li, W. and Baker, N. E. (2007), 'The active role of corpse engulfment pathways during cell competition', *Fly (Austin)*, 1 (5), 274-8.
- Lu, H. and Bilder, D. (2005), 'Endocytic control of epithelial polarity and proliferation in *Drosophila*', *Nat Cell Biol*, 7 (12), 1232-9.



- Mann, R. S. and Morata, G. (2000), 'The developmental and molecular biology of genes that subdivide the body of *Drosophila*', *Annu Rev Cell Dev Biol*, 16, 243-71.
- Martin, F. A., Herrera, S. C., and Morata, G. (2009), 'Cell competition, growth and size control in the *Drosophila* wing imaginal disc', *Development*, 136 (22), 3747-56.
- Matsumine, A., et al. (1996), 'Binding of APC to the human homolog of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein', *Science*, 272 (5264), 1020-3.
- McEwen, D. G. and Peifer, M. (2005), 'Puckered, a *Drosophila* MAPK phosphatase, ensures cell viability by antagonizing JNK-induced apoptosis', *Development*, 132 (17), 3935-46.
- Menendez, J., et al. (2010), 'A tumor-suppressing mechanism in *Drosophila* involving cell competition and the Hippo pathway', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (33), 14651-6.
- Menut, L., et al. (2007), 'A mosaic genetic screen for *Drosophila* neoplastic tumor suppressor genes based on defective pupation', *Genetics*, 177 (3), 1667-77.
- Milan, M., Campuzano, S., and Garcia-Bellido, A. (1997), 'Developmental parameters of cell death in the wing disc of *Drosophila*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (11), 5691-6.
- Milan, M., Perez, L., and Cohen, S. M. (2002), 'Short-range cell interactions and cell survival in the *Drosophila* wing', *Dev Cell*, 2 (6), 797-805.
- Moberg, K. H., et al. (2005), 'Mutations in *erupted*, the *Drosophila* ortholog of mammalian tumor susceptibility gene 101, elicit non-cell-autonomous overgrowth', *Dev Cell*, 9 (5), 699-710.
- Morata, G. (2001), 'How *Drosophila* appendages develop', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2 (2), 89-97.
- Morata, G. and Lawrence, P. A. (1975), 'Control of compartment development by the engrailed gene in *Drosophila*', *Nature*, 255 (5510), 614-7.
- Morata, G. and Ripoll, P. (1975), 'Minutes: mutants of *drosophila* autonomously affecting cell division rate', *Dev Biol*, 42 (2), 211-21.
- Morata, G. and Lawrence, P. A. (1979), 'Development of the eye-antenna imaginal disc of *Drosophila*', *Dev Biol*, 70 (2), 355-71.
- Morata, G. and Ballesteros-Arias, L. (2014), 'Developmental Biology. Death to the losers', *Science*, 346 (6214), 1181-2.
- (2015), 'Cell competition, apoptosis and tumour development', *Int J Dev Biol*, 59 (1-3), 79-86.
- Morata, G., Shlevkov, E., and Perez-Garijo, A. (2011), 'Mitogenic signaling from apoptotic cells in *Drosophila*', *Dev Growth Differ*, 53 (2), 168-76.
- Moreno, E. and Basler, K. (2004), 'dMyc transforms cells into super-competitors', *Cell*, 117 (1), 117-29.
- Moreno, E., Basler, K., and Morata, G. (2002), 'Cells compete for decapentaplegic survival factor to prevent apoptosis in *Drosophila* wing development', *Nature*, 416 (6882), 755-9.
- Murray, M. J., et al. (1983), 'The HL-60 transforming sequence: a ras oncogene coexisting with altered myc genes in hematopoietic tumors', *Cell*, 33 (3), 749-57.
- Neufeld, T. P., et al. (1998), 'Coordination of growth and cell division in the *Drosophila* wing', *Cell*, 93 (7), 1183-93.
- Neuman-Silberberg, F. S., et al. (1984), 'The *Drosophila* ras oncogenes: structure and nucleotide sequence', *Cell*, 37 (3), 1027-33.
- Norman, M., et al. (2012), 'Loss of Scribble causes cell competition in mammalian cells', *J Cell Sci*, 125 (Pt 1), 59-66.
- Nusslein-Volhard, C. and Wieschaus, E. (1980), 'Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*', *Nature*, 287 (5785), 795-801.
- Ollmann, M., et al. (2000), '*Drosophila* p53 is a structural and functional homolog of the tumor suppressor p53', *Cell*, 101 (1), 91-101.
- Pagliarini, R. A. and Xu, T. (2003), 'A genetic screen in *Drosophila* for metastatic behavior', *Science*, 302 (5648), 1227-31.

- Parada, L. F., et al. (1982), 'Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene', *Nature*, 297 (5866), 474-8.
- Perez-Garijo, A. and Steller, H. (2015), 'Spreading the word: non-autonomous effects of apoptosis during development, regeneration and disease', *Development*, 142 (19), 3253-62.
- Perez-Garijo, A., Martin, F. A., and Morata, G. (2004), 'Caspase inhibition during apoptosis causes abnormal signalling and developmental aberrations in *Drosophila*', *Development*, 131 (22), 5591-8.
- Prober, D. A. and Edgar, B. A. (2000), 'Ras1 promotes cellular growth in the *Drosophila* wing', *Cell*, 100 (4), 435-46.
- Radisky, D., Hagios, C., and Bissell, M. J. (2001), 'Tumors are unique organs defined by abnormal signaling and context', *Semin Cancer Biol*, 11 (2), 87-95.
- Raff, M. C., et al. (1993), 'Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system', *Science*, 262 (5134), 695-700.
- Reddy, E. P., et al. (1982), 'A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene', *Nature*, 300 (5888), 149-52.
- Reichman-Fried, M., et al. (1994), 'Elucidation of the role of breathless, a *Drosophila* FGF receptor homolog, in tracheal cell migration', *Genes Dev*, 8 (4), 428-39.
- Rommel, C. and Hafen, E. (1998), 'Ras--a versatile cellular switch', *Curr Opin Genet Dev*, 8 (4), 412-8.
- Rudrapatna, V. A., Cagan, R. L., and Das, T. K. (2012), '*Drosophila* cancer models', *Dev Dyn*, 241 (1), 107-18.
- Ryoo, H. D., Gorenc, T., and Steller, H. (2004), 'Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the JNK and the Wingless signaling pathways', *Dev Cell*, 7 (4), 491-501.
- Santos, E., et al. (1982), 'T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB- and Harvey-MSV transforming genes', *Nature*, 298 (5872), 343-7.
- Sawamoto, K., et al. (1999), 'The *Drosophila* Ral GTPase regulates developmental cell shape changes through the Jun NH(2)-terminal kinase pathway', *J Cell Biol*, 146 (2), 361-72.
- Schnorr, J. D. and Berg, C. A. (1996), 'Differential activity of Ras1 during patterning of the *Drosophila* dorsoventral axis', *Genetics*, 144 (4), 1545-57.
- Shimizu, K., et al. (1983), 'Three human transforming genes are related to the viral ras oncogenes', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80 (8), 2112-6.
- Shivas, J. M., et al. (2010), 'Polarity and endocytosis: reciprocal regulation', *Trends Cell Biol*, 20 (8), 445-52.
- Shlevkov, E. and Morata, G. (2012), 'A dp53/JNK-dependant feedback amplification loop is essential for the apoptotic response to stress in *Drosophila*', *Cell Death Differ*, 19 (3), 451-60.
- Simon, M. A., et al. (1991), 'Ras1 and a putative guanine nucleotide exchange factor perform crucial steps in signaling by the sevenless protein tyrosine kinase', *Cell*, 67 (4), 701-16.
- Simpson, P. and Morata, G. (1981), 'Differential mitotic rates and patterns of growth in compartments in the *Drosophila* wing', *Dev Biol*, 85 (2), 299-308.
- Sosnowski, R. G., Feldman, S., and Feramisco, J. R. (1993), 'Interference with endogenous ras function inhibits cellular responses to wounding', *J Cell Biol*, 121 (1), 113-9.
- Stehelin, D., et al. (1976), 'DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA', *Nature*, 260 (5547), 170-3.
- Struhl, G. and Basler, K. (1993), 'Organizing activity of wingless protein in *Drosophila*', *Cell*, 72 (4), 527-40.
- Tabin, C. J., et al. (1982), 'Mechanism of activation of a human oncogene', *Nature*, 300 (5888), 143-9.
- Taparowsky, E., et al. (1983), 'Structure and activation of the human N-ras gene', *Cell*, 34 (2), 581-6.
- Taparowsky, E., et al. (1982), 'Activation of the T24 bladder carcinoma transforming gene is linked to a single amino acid change', *Nature*, 300 (5894), 762-5.
- Thompson, B. J., et al. (2005), 'Tumor suppressor properties of the ESCRT-II complex component Vps25 in *Drosophila*', *Dev Cell*, 9 (5), 711-20.

- Tournier, C., et al. (2000), 'Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway', *Science*, 288 (5467), 870-4.
- Weigmann, K. and Cohen, S. M. (1999), 'Lineage-tracing cells born in different domains along the PD axis of the developing *Drosophila* leg', *Development*, 126 (17), 3823-30.
- Weston, C. R. and Davis, R. J. (2002), 'The JNK signal transduction pathway', *Curr Opin Genet Dev*, 12 (1), 14-21.
- White, K., et al. (1994), 'Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*', *Science*, 264 (5159), 677-83.
- Woodhouse, E., Hersperger, E., and Shearn, A. (1998), 'Growth, metastasis, and invasiveness of *Drosophila* tumors caused by mutations in specific tumor suppressor genes', *Dev Genes Evol*, 207 (8), 542-50.
- Woodhouse, E., et al. (1994), 'Increased type IV collagenase in Igl-induced invasive tumors of *Drosophila*', *Cell Growth Differ*, 5 (2), 151-9.
- Wu, M., Pastor-Pareja, J. C., and Xu, T. (2010), 'Interaction between Ras(V12) and scribbled clones induces tumour growth and invasion', *Nature*, 463 (7280), 545-8.
- Wu, S., et al. (2008), 'The TEAD/TEF family protein Scalloped mediates transcriptional output of the Hippo growth-regulatory pathway', *Dev Cell*, 14 (3), 388-98.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F., and Currie, A. R. (1980), 'Cell death: the significance of apoptosis', *Int Rev Cytol*, 68, 251-306.
- Xia, Z., et al. (1995), 'Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis', *Science*, 270 (5240), 1326-31.
- Xu, D., et al. (2005), 'The CARD-carrying caspase Dronc is essential for most, but not all, developmental cell death in *Drosophila*', *Development*, 132 (9), 2125-34.
- Xu, T. and Rubin, G. M. (1993), 'Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues', *Development*, 117 (4), 1223-37.
- Yang, L. and Baker, N. E. (2001), 'Role of the EGFR/Ras/Raf pathway in specification of photoreceptor cells in the *Drosophila* retina', *Development*, 128 (7), 1183-91.
- (2003), 'Cell cycle withdrawal, progression, and cell survival regulation by EGFR and its effectors in the differentiating *Drosophila* eye', *Dev Cell*, 4 (3), 359-69.
- Zhang, L., et al. (2008), 'The TEAD/TEF family of transcription factor Scalloped mediates Hippo signaling in organ size control', *Dev Cell*, 14 (3), 377-87.
- Zecca, M., Basler, K., and Struhl, G. (1995), 'Sequential organizing activities of engrailed, hedgehog and decapentaplegic in the *Drosophila* wing', *Development*, 121 (8), 2265-78.
- (1996), 'Direct and long-range action of a wingless morphogen gradient', *Cell*, 87 (5), 833-44.

